

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2005 年 6 月 16 日 (16.06.2005)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2005/054205 A1

(51) 国際特許分類: C07D 231/22, 231/24, 231/46, 231/50, 231/52, 495/10, 403/12, 417/12, 405/06, 401/06, 403/04, 409/06, 417/04, 409/04, 491/048, 487/10, A61K 31/4152, 31/4162, 31/4155, 31/427, 31/4709, 31/433, 31/4439, 31/4355, 31/416, A61P 13/12, 3/10, 25/00, 27/02, 27/12, 9/10, 13/00, 25/28, 25/16, 29/00, 19/02, 17/00, 7/08, 13/12, 9/00, 43/00, 39/00, 39/02

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/018038

(22) 国際出願日: 2004 年 12 月 3 日 (03.12.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2003-407834 2003 年 12 月 5 日 (05.12.2003) JP(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 学校法人  
東海大学 (TOKAI UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1510063  
東京都渋谷区富ヶ谷 2 丁目 2 8 番 4 号 Tokyo (JP).

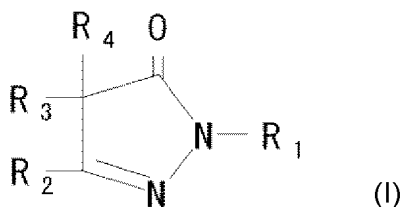
(71) 出願人 および

(72) 発明者: 宮田 敏男 (MIYATA, Toshio) [JP/JP]; 〒  
2591132 神奈川県伊勢原市桜台 2 丁目 1 6-2 5  
エクセル伊勢原 1 0 2 号 Kanagawa (JP). 黒川 清  
(KUROKAWA, Kiyoshi) [JP/JP]; 〒1620061 東京都新  
宿区市谷柳町 4 9 市ヶ谷ヒルズ 4 0 1 Tokyo (JP).(74) 代理人: 河宮 治, 外 (KAWAMIYA, Osamu et al.); 〒  
5400001 大阪府大阪市中央区城見 1 丁目 3 番 7 号  
IMPビル 青山特許事務所 Osaka (JP).(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が  
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,  
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,  
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,  
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA,  
NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,  
SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,  
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護  
が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA,  
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ,  
BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE,

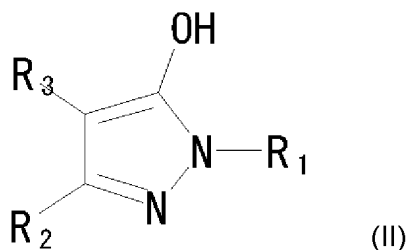
[続葉有]

(54) Title: PROTEIN MODIFIER PRODUCTION INHIBITOR

(54) 発明の名称: 蛋白修飾物生成抑制剤



(57) Abstract: [PROBLEMS] To provide a protein modifier production inhibitor capable of inhibiting of vitamin B6 deficiency disease as a side effect, especially a renal protective agent. [MEANS FOR SOLVING PROBLEMS] There is provided a use, as an active ingredient, of any of free or salt-form compounds of either of the formulae: (I) (II) [wherein R<sub>1</sub> is a substituted or unsubstituted aromatic ring; and each of R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> and R<sub>4</sub> is a hydrogen atom or monovalent organic group, or alternatively R<sub>2</sub> and R<sub>3</sub> cooperate to form a condensed ring or R<sub>3</sub> and R<sub>4</sub> cooperate to represent a divalent organic group, provided that R<sub>3</sub> and R<sub>4</sub> are not simultaneously hydrogen atoms].



(57) 要約: (課題) 副作用としてのビタミンB6欠乏症が抑制された、蛋白修飾物生成抑制剤、特に腎保護剤を提供すること。

(解決手段) 遊離形または塩形の、下記式 (I) または (II) の化合物を有効成分として使用すること: [化 1] または式 (I I): [化 2] [式中、R<sub>1</sub> は置換または非置換の芳香環基であり、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub> および R<sub>4</sub> はそれぞれ水素原子または 1 価の有機基であるか、または R<sub>2</sub> と R<sub>3</sub> は両者合して縮合環を形成するか、もしくは R<sub>3</sub> と R<sub>4</sub> は両者合して 2 価の有機基を表す。ただし、R<sub>3</sub> と R<sub>4</sub> が共に水素原子であることはない。]。

WO 2005/054205 A1



BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU,  
IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),  
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,  
MR, NE, SN, TD, TG).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各*PCT*ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

## 明 細 書

### 蛋白修飾物生成抑制剤

### 技術分野

[0001] この発明は、蛋白修飾物生成抑制剤、特に非酵素的条件下にカルボニル化合物と反応することによって生じる糖化最終産物(Advanced Glycation End Products、以下、「AGEs」と称する)、脂質過酸化最終産物(Advanced Lipoxidation End Products、以下、「ALEs」と称する)等の蛋白修飾物の生成を抑制する薬剤に関する。

### 背景技術

[0002] 糖化反応(グリケーション)とは、ペプチドや蛋白質等のアミノ基と還元糖等のカルボニル基との非酵素的反応から始まる一連の反応(メイラード反応(非特許文献1参照))をいい、初期段階と後期段階に大別することができる。初期段階は糖の濃度と反応時間とに依存する可逆反応であり、前記アミノ基と前記カルボニル基とが非酵素的に反応してシッフ塩基を生成し、さらにアマドリ転位によりアマドリ化合物を形成する。

[0003] 後期段階では初期段階で生成したアマドリ化合物が非可逆的に脱水、縮合、環状化、酸化、断片化、重合、転位等を受け、最終的に AGEsと呼ばれる蛋白修飾物を形成する。糖の自動酸化等により、3-デオキシグルコソン(以下、「3-DG」と称する)、グリオキサール(以下、「GO」と称する)およびメチルグリオキサール(以下、「MGO」と称する)等の反応性の高いジカルボニル化合物が生成するが、これらのカルボニル化合物も蛋白と反応し、多くの場合蛋白質のリジン残基やアルギニン残基等が修飾されたAGEsを生成する。

[0004] また、酸化ストレス下では、生体内に豊富に存在する糖、脂質、アミノ酸等は酸化反応等により、反応性の高いカルボニル化合物へと変化する。その結果生じる、GO、MGO、アラビノース、グリコールアルデヒドなどの化合物はAGEsの前駆物質となる。また、アスコルビン酸の酸化により生成するデヒドロアスコルビン酸もAGEsの前駆物質となる。これらの前駆物質はいずれもカルボニル基を有しており、蛋白質のアミノ基と非酵素的に反応してシッフ塩基を生成してAGEsを形成する(非特許文献2参照)

- 。
- [0005] 一方、酸化ストレス下では脂質過酸化も進行し、マロンジアルデヒド、ヒドロキシノネナールおよびアクロレインのような、様々なカルボニル化合物が形成される(非特許文献3参照)。これらのカルボニル化合物も蛋白質のアミノ基等と反応し、マロンジアルデヒド修飾リジンやヒドロキシノネナール修飾物等のALEsと呼ばれる蛋白修飾物を形成する(非特許文献2参照)。
- [0006] 更に、セリンやスレオニンなどのアミノ酸も酸化によりアクロレイン、GOなどのカルボニル化合物が生成し、蛋白修飾物を形成する(非特許文献4参照)。多くのカルボニル化合物は酸化的経路で生成されるが、3-DGのように非酸化的経路を経て生成されるカルボニル化合物も存在する。
- [0007] 公知のAGEs生成経路として、1)シッフ塩基、アマドリ化合物から3-DGを経由する経路、2)シッフ塩基が酸化的にグリコールアルデヒド-アルキルイミンへ変化し、アルドアミンを経てAGEsに至る経路、3)アルドアミンがグリオキサールモノアルキルイミンを経てAGEsに至る経路、4)アマドリ化合物から2, 3-エンジオールを経て生成されるMGOを中間体とする経路、5)その他等がある。
- [0008] 最近、AGEsのひとつであるカルボキシメチルリジンが不飽和脂肪酸の脂質酸化反応の結果生じるGOによっても生成することが明らかになり、糖化・酸化反応と脂質酸化反応が共通の基盤で起こっていると考えられる。
- [0009] 以上のように、糖、脂質、アミノ酸およびアスコルビン酸から酸化的、非酸化的経路により生成されたカルボニル化合物は、蛋白を非酵素的に修飾して最終的にAGEsやALEs等の蛋白修飾物を形成するに至る。特に、複数の反応経路を経て生成されたカルボニル化合物により蛋白修飾反応が亢進している状態をカルボニル過剰による蛋白修飾、すなわち、カルボニルストレスと呼んでいる。
- [0010] 公知のAGEsとしては、ペントシジン(非特許文献5参照)、クロスリン(非特許文献6参照)、X1(フルオロリンク)、ピロピリジン(非特許文献7参照)、ピラリン(非特許文献8参照)、カルボキシメチルリジン(非特許文献9参照)、イミダゾロン化合物(非特許文献10参照)、カルボキシエチルリジン(非特許文献11参照)、MGOダイマー(非特許文献12参照)、GOダイマー(非特許文献13参照)、イミダゾリジン(非特許文献14参

照)およびアルグピリミジン(非特許文献15参照)等が知られている。

- [0011] 現在クローニングされているAGEs受容体として、RAGE(非特許文献16参照)、マクロファージスカベンジャー受容体クラスA(非特許文献17参照)、ガレクチン3(非特許文献18参照)、OST-48および80K-H等がある(非特許文献17参照)。
- [0012] 血管組織においてAGEsがRAGE(免疫グロブリンスーパーファミリーに属する細胞膜貫通型蛋白質)に結合すると、細胞内で活性酸素が生成し、p21ras/MAPK経路が活性化され(非特許文献19参照)、これにより転写因子NF- $\kappa$ B活性化が誘導され、VCAM-1等の血管障害関連因子の発現が誘導されることが報告されている(非特許文献20参照)。また、AGEsはRAGEを介して、微小血管の内皮細胞の増殖を制御し、恒常性維持に重要な役割を果たしている周皮細胞の増殖を抑制するとともに、毒性効果を発揮することが報告されている(非特許文献21参照)。
- [0013] さらに、AGEsはRAGEを介して、微小血管の内皮細胞に直接的に作用し血管新生を促進すること、PGI<sub>2</sub>の産生を阻害して血栓傾向となること(非特許文献22参照)が報告されている。その他、AGEsやALEs等の生理活性として、メサンギウム細胞の基質産生の亢進、単球遊走能の亢進、マクロファージからの炎症性サイトカインの放出、滑膜細胞のコラゲナーゼ産生促進、破骨細胞の活性化、血管平滑筋の増殖作用、血小板凝集の促進、NO活性とその平滑筋弛緩反応の抑制が報告されている(非特許文献23参照)。
- [0014] AGEsが関与する疾患として、1)糖尿病合併症である腎症(非特許文献24参照)、神経障害(非特許文献25参照)、網膜症(非特許文献21参照)および白内障、2)動脈硬化(非特許文献26参照)、3)透析合併症である透析アミロイドーシス(非特許文献27参照)および腹膜透析患者における腹膜硬化症、4)中枢神経疾患であるアルツハイマー病(非特許文献28参照)、ピック病およびパーキンソン病、5)リウマチ性関節炎(非特許文献29参照)、6)日光弾性線維症、7)老化、8)腎不全(非特許文献30参照)等が知られている。その他、糖尿病の場合、血管内皮由来の血管拡張がAGEsによって障害されること(非特許文献31参照)、AGEsが腎硬化を促進させること(非特許文献32参照)等が報告されている。
- [0015] 以上のことから、AGEsを初めとする蛋白修飾物は、直接的にまたは受容体を介し

て生体に悪影響を与えることが明らかとなっている。

- [0016] 一方、腎機能が低下するに従って、血中のAGEsの濃度が上昇することが知られている。腎機能低下により、分子量5kDa以下と考えられるカルボニル化合物は体内に蓄積する。ペントシジンやピラリン等の場合、遊離型も存在するが、血清アルブミン等の蛋白結合型が大部分を占めている(非特許文献33参照)。また、血中ペントシジン濃度は糸球体濾過機能の影響を強く受けるという報告がある(非特許文献34参照)。
- [0017] この様に、AGEsはその大部分が腎において処理され、健康時には血中濃度は低く保たれているが、腎機能が低下すると尿毒症毒素(uremic toxin)として慢性の生物活性をもたらすようになる。
- [0018] 透析療法によって遊離型のものは除去されるが、蛋白結合型のものや分子内架橋を形成するものは除去することは困難である(非特許文献35参照)。従って、腎不全期間の経過と共に蛋白修飾物の生体内蓄積量は増加する。また、生体内で糖が反応する基本的な過程以外に食品中から供給される遊離型AGEsや、生体内で既に形成されたアマドリ化合物などから形成される活性の強い3-DG、GO、MGOなどの中間体が次々に蛋白と反応し、AGEsの産生を促進することが認められている。また、血液は透析膜と接触することによって、補体系や白血球の活性化などの様々な影響を受け、フリーラジカルの産生亢進へとつながる等、透析療法そのものによる酸化の亢進も存在し、AGEs生成の一因となっている。
- [0019] ゆえに、透析療法での対策としては透析導入の初期からこれらの遊離型物質の除去を図り、結合型のAGEs形成を極力抑制することが重要であり、上記のように結合型のAGEsを透析療法によって除去することは困難であるので、透析療法では蛋白修飾物の生成を抑制する薬物の開発が希求されている。
- [0020] また、腎機能に起因するばかりではなく、腎不全に伴う抗酸化防御機構の低下も蛋白修飾物の蓄積に関与していると考えられる。腎不全患者では、血中還元型グルタチオンに対する酸化型グルタチオンの上昇(非特許文献36参照)、グルタチオン依存酵素群の活性低下、保存期腎不全血漿グルタチオンペルオキシダーゼの低下(非特許文献37参照)、全血中グルタチオンの低下(非特許文献38参照)、ならびに血漿セレン濃度の低下に対する血漿スーパーオキシドジスムターゼの活性上昇(

非特許文献39参照)といった抗酸化能の不均衡が示唆されている(非特許文献40参照)。

[0021] また、一般に慢性腎不全の患者では、高血糖の有無に関わらず血中や組織中に反応性の高いカルボニル化合物やAGEsが著しく蓄積していることが報告されている(非特許文献41参照)。腎不全においては、非酵素的化学反応によりカルボニル化合物が高負荷の状態(カルボニルストレス)となり、蛋白質修飾が亢進される病態が存在しており、糖・脂質からカルボニル化合物が生成され蛋白質を修飾するためであると考えられる(非特許文献42参照)。

[0022] ゆえに、様々な要因によって生じる蛋白修飾物の生成を抑制することが、組織障害の軽減につながり、AGEs等の蛋白修飾物質が関与する病態を予防および治療することができる。

[0023] 慢性腎不全患者に行われる透析には、血液透析と腹膜透析がある。腹膜透析の場合、血中の老廃物は腹膜を通して腹膜透析液中に排泄される。高浸透圧の腹膜透析液(グルコース、イコデキストリンまたはアミノ酸等を含有する)は、腎不全患者の血中に蓄積した反応性の高いカルボニル化合物(例えば腎不全患者の血中に酸化ストレスに伴って蓄積する、炭水化物に由来するカルボニル化合物(アラビノース、GO、MGO、3-DG)、アスコルビン酸に由来するカルボニル化合物(デヒドロアスコルビン酸)、脂質に由来するカルボニル化合物(ヒドロキシノネナール、マロンジアルデヒド、アクロレイン))を、腹膜を介して腹腔内の腹膜透析液中に集める作用がある。

[0024] また、腹膜透析液の滅菌や保存中に、反応性の高いカルボニル化合物(3-DG、5-ヒドロキシメチルフルフラール、ホルムアルデヒド、アセトアルデヒド、GO、MGO、レブリン酸、フルフラール、アラビノースなどのカルボニル化合物)が腹膜透析液中に生成することが知られている(非特許文献43参照)。

[0025] そのため腹膜透析液中の前記カルボニル化合物濃度は上昇し、蛋白修飾物質の生成が亢進する。その結果、腹膜の機能が低下し、除水能の低下や腹膜硬化症への進展に関与すると考えられる。(非特許文献44参照)。

[0026] 実際に腹膜透析患者においては、導入されたグルコースによって腹腔内がカルボニルストレス状態となっていることは、内皮および中皮の免疫組織学的検討から証明

されている(非特許文献45参照)。

- [0027] この様に、透析患者においてもカルボニル化合物による蛋白修飾物の生成が腹膜の形態学的変化およびこれに伴う機能(除水能)の低下の原因となっていることが推測されており、その改善方法の提供が求められている。
- [0028] 以上の事実と腎不全をはじめとする種々の病態を考え合わせると、カルボニル化合物蓄積がAGEs産生亢進の原因のひとつであると考えられ(非特許文献46参照)、AGEsの産生を抑制することが、AGEsが関連する病態に対し有効であると考えられる。
- [0029] 代表的なAGEs生成阻害薬としてアミノグアニジンがある。アミノグアニジンはグルコース、シッフ塩基やアマドリ生成物から生成される3-DGなどのジカルボニル化合物と反応してチアゾリンを形成することによってAGEs生成を阻害すると考えられている。糖尿病モデル動物を用いた解析では、糖尿病性腎症(非特許文献47参照)、網膜症(非特許文献48参照)および白内障(非特許文献49参照)の進展を遅延させる効果が確認されている。
- [0030] 他に、この種に属する化合物としてピリドキサミン誘導体(ピリドリノ)がある。また、OPB-9195((±) 2-イソプロピリデンヒドラゾノ-4-オキソ-チアゾリジン-5-イルアセトアニリド)はヒドラジンの窒素原子がカルボニル基と反応して安定な構造を形成し、遊離または蛋白に結合した反応性カルボニルを捕捉することにより(非特許文献50参照)、in vitroでAGEsのみならずALEsの生成も抑制する。メホルミンやブホルミン等のビグアナイド化合物もカルボニル化合物を捕捉できるため、(非特許文献51参照)AGEs生成阻害薬として利用できる可能性がある。さらに、AGEsの特徴である架橋を切断するタイプのAGEs阻害剤、アマドリ化合物を分解する酵素(amadoria se)等の提案もされている。
- [0031] 一方、カルボニル化合物を消去することにより、AGEsやALEsの生成を阻害する可能性も検討されている。カルボニル化合物の消去にはいくつかの酵素や酵素的経路が存在し、例えばアルドース還元酵素、アルデヒドデヒドロゲナーゼやグリオキサラーゼ経路が挙げられるが(非特許文献52参照)還元型グルタチオン(GSH)やNAD(P)Hなどのレドックス補酵素はこれらの経路の活性に重要な要素である。



- [0032] これらの消去系の低下は同時に多数のカルボニル化合物の上昇につながる。MG O、GOなどのカルボニル化合物はGSHのチオール基と反応し、結果的に酵素グリオキサラーゼにより代謝される。NAD(P)Hはグルタチオン還元酵素を活性化し、GSHレベルを上昇させる。すなわち、細胞内レドックス機構の不均衡によるGSHおよびNAD(P)Hの低下によりカルボニル化合物の消去系が阻害され、AGEsやALEsの蓄積につながると考えられる。また、糖尿病においては、高血糖によりポリオール経路が活性化され、NAD(P)HやGSHが低下し、結果的にカルボニル化合物の消去系が低下することが示唆される。
- [0033] 前述したようにGSHおよびNAD(P)Hなどのチオール濃度の低下がカルボニル化合物消去の低下につながり、結果としてAGEsやALEsを形成する原因のひとつとなっているとすれば、チオールレベルを上昇させることによりカルボニル化合物を減少できる可能性がある。これには、GSH、システイン、アセチルシステイン等によりチオール基を補充する方法、ビタミンEやユビキノール等によりGSH需要を低下させる方法、アルドース還元酵素阻害薬等によりポリオール系を阻害する方法が提案されている。さらに、アミノグアニジン、ピリドキサミン、ヒドラジン、ビグアナイド化合物およびSH基含有化合物を用いて、カルボニル化合物をトラップさせる方法も提案されている(特許文献1参照)。
- [0034] 以上詳細に述べたように、AGEsおよびALEsの生成を阻害することが、これらに関連する病態を予防または治療できる方法である。
- [0035] 特許文献1:国際公開WO00/10606 号  
非特許文献1:メイラード, エル, シー(Maillard, L. C.)ら著, 「コンプテス・レンダス・ヘブドマダイレス・デス・シンシズ・デ・ラ・ソサイエテ・デ・バイオロジー(Compt. Rend. Soc. Biol.)」, (フランス), 1912年, 第72巻, p599  
非特許文献2:ミヤタ, ティー(Miyata, T.)ら著, 「キドニー・インターナショナル(Kidney Int.)」, (アメリカ), 1999年, 第55巻, p389-399  
非特許文献3:エステルバウアー, エイチ(Esterbauer, H.)ら著, 「フリーラジカル・バイオロジー・アンド・メディスン(Free Radic. Biol. Med.)」, (アメリカ), 1991年, 第11巻, p81-128

非特許文献4:アンダーソン, エム, エム(Anderson, M. M.)ら著, 「ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスティゲーション(J. Clin. Invest.)」, (アメリカ), 1997年, 第99巻, p424-432

非特許文献5:セル, ディー, アール(Sell, D. R.)ら著, 「ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.)」, (アメリカ), 1989年, 第264巻, p21597-21602

非特許文献6:ナカムラ, ケイ(Nakamura, K.)ら著, 「ジャーナル・オブ・ザ・ケミカル・ソサエティー・ケミカル・コミュニケーションズ(J. Chem. Soc. Chem. Commun.)」, (イギリス), 1992年, 第15巻, p992-994

非特許文献7:ハヤセ, エフ(Hayase, F.)ら著, 「バイオサイエンス・バイオテクノロジー・アンド・バイオケミストリー(Biosci. Biotech. Biochem.)」, (日本), 1994年, 第58巻, p1936-1937

非特許文献8:ヌジョロージ, エフ, ジー(Njoroge, F. G.)ら著, 「カルボハイドレート・リサーチ(Carbohydr. Res.)」, (オランダ), 1987年, 第167巻, p211-220

非特許文献9:アーメッド, エム, ユー(Ahmed, M. U.)ら著, 「ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.)」, (アメリカ), 1986年, 第261巻, p4889-4894

非特許文献10:ハヤセ, エフ(Hayase, F.)ら著, 「バイオサイエンス・バイオテクノロジー・アンド・バイオケミストリー(Biosci. Biotech. Biochem.)」, (日本), 1995年, 第59巻, p1407-1411

非特許文献11:アーメッド, エム, ユー(Ahmed, M. U.)ら著, 「バイオケミカル・ジャーナル(Biochem. J.)」, (イギリス), 1997年, 第324巻, p565-570

非特許文献12:ブリンクマン, イー(Brinkmann, E.)ら著, 「ジャーナル・オブ・ケミカル・ソサエティー・パーキン・トランスザクションズ(J. Chem. Soc. Perkin. Trans.)」, (イギリス), 1995年, 第2巻, p1-2

非特許文献13:ウェルークネヒト, ケイ, ジェイ(Well-Knecht, K. J.)ら著, 「

ジャーナル・オブ・オーガニック・ケミストリー( J. Org. Chem. )」, (アメリカ)1995年, 第60巻, p6246-6247

非特許文献14:ナガラ, アール, エイチ(Nagaraj, R. H.)ら著, 「ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem. )」, (アメリカ), 1996年, 第271巻, p19338-19345

非特許文献15:シパノバ, アイ, エヌ(Shipanova, I. N.)ら著, 「アーカイブス・オブ・バイオケミストリー・アンド・バイオフィジックス(Arch. Biochem. Biophys. )」, (アメリカ), 1997年, 第334巻, p29-36

非特許文献16:ネッパー, エム(Neeper, M.)ら著, 「ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem. )」, (アメリカ), 1992年, 第267巻, p14998-15004

非特許文献17:スズキ, エイチ(Suzuki, H.)ら著, 「ネイチャー(Nature)」, (イギリス)1997年, 第386巻, p292-295

非特許文献18:ブラッサラ, エイチ(Vlassara, H)ら著, 「モレキュラー・メディスン(Molecular Medicine)」, (アメリカ), 1995年, 第1巻, p634-646

非特許文献19:ランダー, エイチ, エム(Lander, H. M.)ら著, 「ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem. )」, (アメリカ), 1997年, 第272巻, p17810-17814

非特許文献20:チャッペイ, オー(Chappey, O.)ら著, 「ヨーロピアン・ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスティゲーション(Eur. J. Clin. Invest. )」, (イギリス), 1997年, 第27巻, p97-108

非特許文献21:ヤマギシ, エス(Yamagishi, S.)ら著, 「バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ(Biochem. Biophys. Res. Commun. )」, (アメリカ), 1995年, 第213巻, p681-687

非特許文献22:ヤマギシ, エス(Yamagishi, S.)ら著, 「エフイービーエス・レター(FEBS Lett. )」, (オランダ), 1996年, 第384巻, p103-106

非特許文献23:ドイ, ティー(Doi, T.)ら著, 「プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユナイテッド・ステイツ・オブ・アメリカ

(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)」、(アメリカ), 1992年, 第89巻, p2873-2877

非特許文献24:ホリエ, ケイ(Horie, K.)ら著, 「ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスティゲーション(J. Clin. Invest.)」、(アメリカ), 1997年, 第100巻, p2995-3004

非特許文献25:スギモト, ケイ(Sugimoto, K.)ら著, 「ダイアベートロジア(Diabetologia)」、(ドイツ), 1997年, 第40巻, p1380-1387

非特許文献26:パーク, エル(Park, L.)ら著, 「ネイチャー・メディシン(Nat. Med.)」、(アメリカ), 1998年, 第4巻, p1025-1031

非特許文献27:ミヤタ, ティー(Miyata, T.)ら著, 「ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスティゲーション(J. Clin. Invest.)」、(アメリカ)1993年, 第92巻, p1243-1252

非特許文献28:スミス, エム, エー(Smith, M. A.)ら著, 「プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ユー・エス・エー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)」、(アメリカ), 1994年, 第91(12)巻, p5710-5714

非特許文献29:ミヤタ, ティー(Miyata, T.)ら著, 「バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ(Biochem. Biophys. Res. Commun.)」、(アメリカ), 1999年, 第244巻, p45-49

非特許文献30:マキタ, ゼット(Makita, Z.)ら著, 「ニュー・イングランド・ジャーナル・オブ・メディシン(N. Engl. J. Med.)」、(アメリカ), 1991年, 第325巻, p836-842

非特許文献31:ブカラ, アール(Bucala, R.)ら著, 「ジャーナル・オブ・クリニカル・インベスティゲーション(J. Clin. Invest.)」、(アメリカ), 1991年, 第87巻, p432-438

非特許文献32:ブラッサラ, エイチ(Vlassara, H.)ら著, 「プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ユー・エス・エー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)」、(アメリカ), 1994年, 第91巻, p11704-1

1708

非特許文献33:ミヤタ, ティー(Miyata, T.)ら著, 「ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・ソサエティー・オブ・ネフロロジー(J. Am. Soc. Nephrol.)」, (アメリカ), 1996年, 第7巻, p1198-1206

非特許文献34:スギヤマ, エス(Sugiyama, S.)ら著, 「ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・ソサエティー・オブ・ネフロロジー(J. Am. Soc. Nephrol.)」, (アメリカ), 1998年, 第9巻, p1681-1688

非特許文献35:ミヤタ・ティン(Miyata, T.)ら著, 「キドニー・インターナショナル(Kidney Int.)」, (アメリカ), 1996年, 第49巻, p1304-1313

非特許文献36:カネストラリ, エフ(Canestrari, F.)ら著, 「アクタ・ヘマトロジカ(Acta Haematol.)」, (スイス), 1994年, 第91巻, p187-193

非特許文献37:ウエダ, ワイ(Ueda, Y.)ら著, 「バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ(Biochem. Biophys. Res. Commun.)」, (アメリカ), 1998年, 第245巻, p785-790

非特許文献38:カネストラリ, エフ(Canestrari, F.)ら著, 「アクタ・ヘマトロジカ(Acta Haematol.)」, (スイス), 1994年, 第91巻, p187-193

非特許文献39:リチャード, エム, ジェイ(Richard, M. J.)ら著, 「ネフロン(Nephron)」, (スイス), 1991年, 第57巻, p10-15

非特許文献40:ヤドウル, エム(Jadoul, M.)ら著, 「キドニー・インターナショナル(Kidney Int.)」, (アメリカ), 1999年, 第55巻, p2487-2492

非特許文献41:ミヤタ, ティン(Miyata, T.)ら著, 「キドニー・インターナショナル(Kidney Int.)」, (アメリカ)1997年, 第51巻, p1170-1181

非特許文献42:ミヤタ, ティン(Miyata, T.)ら著, 「キドニー・インターナショナル(Kidney Int.)」, (アメリカ), 1999年, 第55巻, p389-399

非特許文献43:リチャード, ジェイ, ユー(Richard, J. U.)ら著, 「ファンダメンタル・アンド・アプライド・トキシコロジー(Fund. Appl. Toxic.)」, (アメリカ), 1984年, 第4巻, p843-853

非特許文献44:ミヤタ, ティン(Miyata, T.)ら著, 「キドニー・インターナショナル

ル(Kidney Int. )」, (アメリカ), 2000年, 第58巻, p425-435

非特許文献45:ヤマダ, ケイ(Yamada, K. )ら著, 「クリニカル・ネフロロジー(Clin. Nephrol. )」, (ドイツ), 1994年, 第42巻, p354-361

非特許文献46:ミヤタ, ティー(Miyata, T. )ら著, 「ネフロロジー・ダイアリシス・トランスプランテーション(Nephrol. Dial. Transplant. )」, (イギリス), 1997年, 第12巻, p255-258

非特許文献47:エデルステイン, ディー(Edelstein, D. )ら著, 「ダイアベトロジー(Diabetologia), (ドイツ), 1992年, 第35巻, p96-101

非特許文献48:ハメス, エイチ, ピー(Hammes, H. P. )ら著, 「プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ユエ・エス・エー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)」, (アメリカ), 1991年, 第88巻, p11555-11561

非特許文献49:マツモト, ケイ(Matsumoto, K. )ら著, 「バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ(Biochem. Biophys. Res. Commun. )」, (アメリカ), 1997年 第241巻, p352-354

非特許文献50:ナカムラ, エス(Nakamura, S. )ら著, 「ダイアベーツ(Diabetes)」, (アメリカ), 1997年, 第46巻, p895-899

非特許文献51:ベイスウエンゲル, ピー, ジェイ(Beisswenger, P. J. )ら著, 「ダイアベーツ(Diabetes), (アメリカ), 1999年, 第48巻, p198-202

非特許文献52:ソマリー, ピー, ジェイ(Thornalley, P. J. )ら著, 「エンドクリノロジー・アンド・メタボリズム(Endocrinol. Metab. )」, (アメリカ), 1996年, 第3巻, p149-166

## 発明の開示

### 発明が解決しようとする課題

- [0036] 本発明者らは、上記従来技術に基づく知見を前提として、非酵素的条件下、カルボニル化合物と反応することによって生じる蛋白修飾物(AGEsおよび／またはALEs)が関与する病態を予防および／または治療するための薬剤を開発すべく鋭意研究を行った結果、先に、3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オンまたは薬理学

的に許容されるその塩が効果的にAGEs、ALEs等の蛋白修飾物の生成を抑制する事実を発見し、この発見事実に基づいて、当該物質を有効成分とする蛋白修飾物生成抑制剤の発明を完成した(特願2003-076955号明細書)。

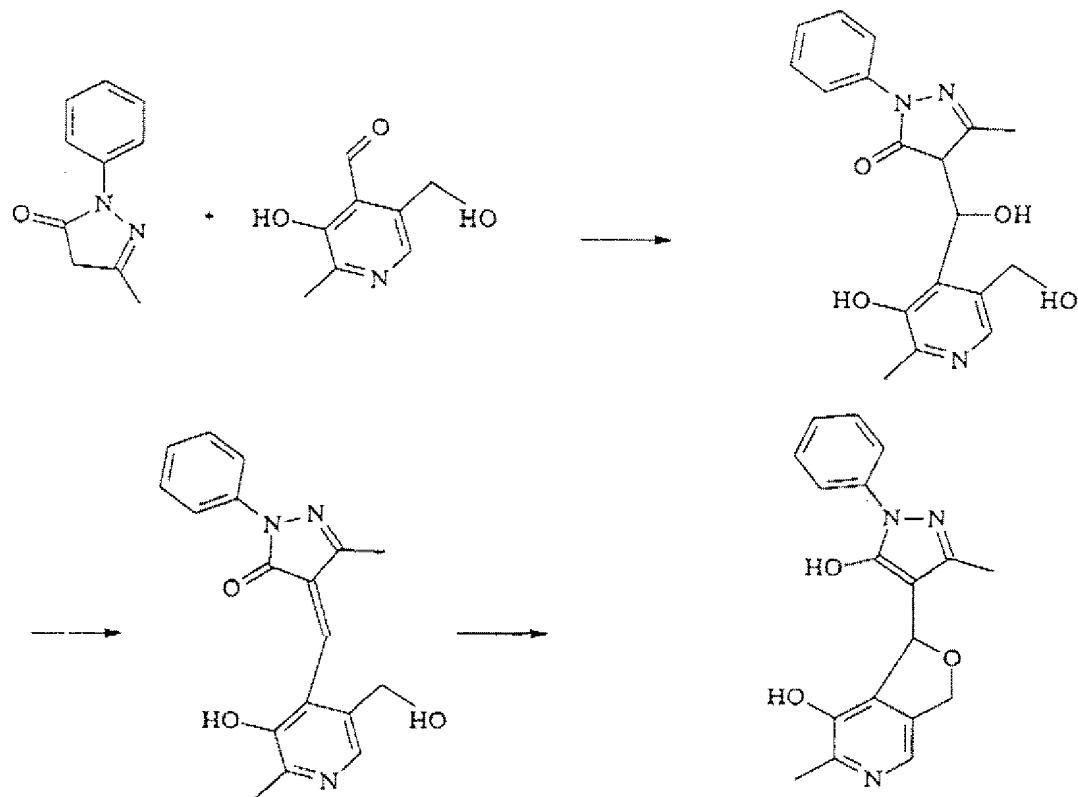
- [0037] 本発明者らは、その後さらに研究を続け、上記3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オンの1位フェニル基および3位メチル基を他の置換基に変化させた類縁体についても同様の活性を有することを見出したが、同時に、それら3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オンやその類縁体は、これを生体に投与した場合、ビタミンB6欠乏症を起こすことが判明した。そこで、この欠陥を克服すべくさらに研究を進めたところ、そのようなビタミンB6欠乏症は、血中に存在するビタミンB6分子が3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オンやその類縁体の基本骨格である2-ピラゾリン-5-オン環によって捕捉されることに起因するものであることが明らかとなった。そして、そのような捕捉が、当該2-ピラゾリン-5-オン環の4位メチレン基に対してビタミンB6分子が結合することによるものであることも明らかとなった。

#### 課題を解決するための手段

- [0038] 本発明は、このような解明事実に基づいて完成されたものであって、その目的とするところは、蛋白修飾物生成抑制剤として有用な3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オンやその類縁体について、不可避の副作用であるビタミンB6欠乏症を抑制することにあり、この目的は、本発明により、3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オンやその類縁体に対し、その4位メチレン基にビタミンB6分子が結合することを妨害する置換基を導入することにより達成された。
- [0039] ただし、4位メチレン基に導入された置換基は、その種類により必ずしも安定に存在するとは限らない。たとえば、4位メチレン基にピリドキサル残基を導入する目的で、3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オンにピリドキサルを反応させたところ、現実には得られるものは、4-(3-ヒドロキシ-5-ヒドロキシメチル-2-メチルピリジン-4-イルメチレン)-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オンではなく、1-(5-ヒドロキシ-3-メチル-1-フェニル-1H-4-イル)-6-メチル-1, 3-ジヒドロフロ[3, 4-c]ピリジン-7-オールである。
- [0040] これは次式に示すように、いったん前者が形成された後、分子内転位して後者を生

成するものと考えられる：

[化1]



[0041] 現時点までの研究によれば、ビタミンB6分子の結合を妨害するために4位メチレン基に置換基が導入された化合物は、それが上記のように分子内転位すると否とを問わず、一般に蛋白修飾物生成抑制作用を発揮する。

[0042] (発明を実施するための最良の形態)

すなわち、本発明は、蛋白修飾物生成抑制作用を有し、かつ、副作用としてのビタミンB6欠乏症が抑制された化合物を有効成分とする、蛋白修飾物生成抑制剤を提供するものである。その技術的範囲には、具体的に、以下の技術的態様が包含される：

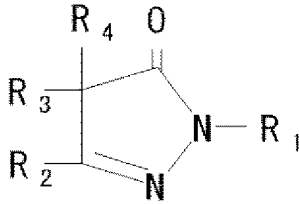
(1) 遊離形または塩形の1-置換または非置換-3-置換または非置換-2-ピラゾリン-5-オンの4位に、ビタミンB6分子の結合を妨げる置換基(ビタミンB6分子自体に由来するものを含む)を導入した化合物またはその分子内転位体を有効成分とする



、蛋白修飾物生成抑制剤。

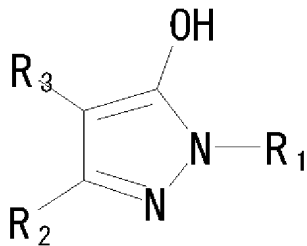
(2) 有効成分である化合物が、遊離形または塩形の式(I)：

[化2]



または式(II)：

[化3]



[式中、R1は置換または非置換の芳香環基であり、R2、R3およびR4はそれぞれ水素原子または1価の有機基であるか、またはR2とR3は両者合して縮合環を形成するか、もしくはR3とR4は両者合して2価の有機基を表す。ただし、R3とR4が共に水素原子であることはない。]

で示される化合物から選択される、上記(1)項記載の蛋白修飾物生成抑制剤。

(3) R1で表される芳香環基が、4個を越えることのないヘテロ原子を含むことがある、20個を越えることのない環構成原子を有する炭素環または異項環の芳香環基であって、3つを越えない置換基を有することがあるものである、上記(2)項記載の蛋白質修飾物生成抑制剤。

(4) R2、R3またはR4で表される1価の有機基が、それぞれ独立して、炭素数30個を越えない、鎖状または環状の脂肪族、脂環式または芳香族炭化水素基であって、3つを越えない置換基を有することのあるものであるか、またはハロゲン基、ニトロ基、アミノ基、ヒドロキシ基、チオール基、カルボキシ基、カルボキシ(低級)アルキル基、低級アルコキシカルボニル基、ホルミル基、低級アルカノイル基、低級アルキルアミノ

基、ジ(低級)アルキルアミノ基、低級アルカノイルアミノ基、アリール(低級)アルカノイル基、アリールオキシアミノ基、スルホン酸基または3ー7員ヘテロ環基であって、置換基を有することのあるものである、上記(2)または(3)項記載の蛋白修飾物生成抑制剤。

(5) R2とR3が両者合して形成する縮合環が、5ー6員炭素飽和環であって、置換基を有することもあるものである、上記(2)または(3)項記載の蛋白修飾物生成抑制剤。

(6) R3とR4が両者合して形成する2価の有機基が、フェニルメチレン、フェニルアルケニルメチレン、キノリニルメチレン、フラニルメチレン、ジアゾリルメチレン、アミノメチレン、ジ(低級)アルキルアミノメチレン、ピリジルメチレンおよびチオフェニルメチレンから選択されたものであって、置換基を有することもあるものである、上記(2)または(3)項記載の蛋白修飾物生成抑制剤。

(7) 置換基が、低級アルキル基、低級アルケニル基、低級アルコキシ基、低級アルケニルオキシ基、低級アルカノイル基、ハロ(低級)アルキル基、カルボキシル基、低級アルコキシカルボニル基、カルボキシ(低級)アルキル基、ハロゲン基、ニトロ基、アミノ基、低級アルキルアミノ基、ジ(低級)アルキルアミノ基、低級アルカノイルアミノ基、ヒドロキシ基、チオール基、ヒドロキシスルホニル基、アミノスルホニル基、アリール(低級)アルカノイル基、アリールオキシアミノ基、アリール基、アリール(低級)アルキル基、シクロ(低級)アルキル基、シクロ(低級)アルケニル基、シクロ(低級)アルキル(低級)アルキル基および3ー7員ヘテロ環基から選択されたものである、上記(3)ー(7)項のいずれか記載の蛋白修飾物生成抑制剤。

(8) 式(I)において、R1がフェニル基、R2がメチル基、R3とR4が合して3ーヒドロキシー5ーヒドロキシメチルー2ーメチルピリジンー4ーイルメチレン基である、上記(2)項記載の蛋白修飾物生成抑制剤。

(9) 式(II)において、R1がフェニル基、R2がメチル基、R3が6ーメチルー1, 3ージヒドロフロ[3, 4-c]ピリジンー7ーオール基である、上記(2)項記載の蛋白修飾物生成抑制剤。

(10) 蛋白修飾物が、AGEs、ALEsおよびこれらの組合せよりなる群から選択され

るものである、上記(1)～(9)項のいずれか記載の蛋白修飾物生成抑制剤。

(11) 蛋白修飾物がAGEsである、上記(10)項記載の蛋白修飾物生成抑制剤。

(12) AGEsがペントシジンである、上記(11)記載の蛋白修飾物生成抑制剤。

(13) 上記(1)～(12)項のいずれか記載の蛋白修飾物生成抑制剤を含む、腎組織保護剤。

(14) 上記(1)～(12)項のいずれか記載の蛋白修飾物生成抑制剤を含む、腹膜透析液。

(15) 上記(1)～(12)項のいずれか記載の蛋白修飾物生成抑制剤を含む、血液透析液。

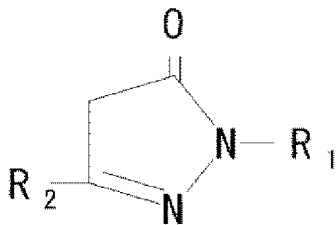
(16) 上記(1)～(12)項のいずれか記載の蛋白修飾物生成抑制剤を液体試料と接触させる工程を含む、液体試料のカルボニル化合物含有量を低減させる方法。

(17) 上記(1)～(12)項のいずれか記載の蛋白修飾物生成抑制剤を患者の血液または腹膜透析液と接触させる工程を含む、蛋白修飾物の生成抑制方法。

(18) 蛋白修飾物生成抑制剤として有用な、遊離形または塩形の1-置換または非置換-3-置換または非置換-2-ピラゾリン-5-オンの4位に、ビタミンB6分子の結合を妨げる置換基(ビタミンB6分子自体に由来するものを含む)を導入することを特徴とする、当該蛋白修飾物生成抑制剤に起因するビタミンB6欠乏症を抑制する方法。

(19) 1-置換または非置換-3-置換または非置換-2-ピラゾリン-5-オンが、式(I II)：

[化4]



[式中、R1は水素原子または置換または非置換の芳香環基であり、R2は水素原子または1価の有機基である。]

で表される化合物から選択されるものである、上記(18)記載の方法。

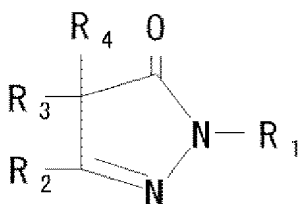
(20) 4位に導入される、ビタミンB6分子の結合を妨げる置換基が有機基から選択

されるものである、上記(16)項記載の方法。

(21) 遊離形または塩形の1-置換または非置換-3-置換または非置換-2-ピラゾリン-5-オンの4位に、ビタミンB6分子の結合を妨げる置換基(ビタミンB6分子自体に由来するものを含む)を導入した化合物またはその分子内転位体。

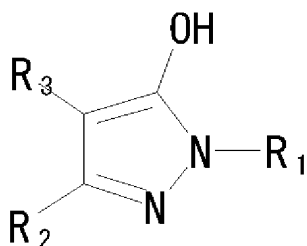
(22) 遊離形または塩形の式(I)：

[化5]



または式(II)：

[化6]



[式中、R1は置換または非置換の芳香環基であり、R2、R3およびR4はそれぞれ水素原子または1価の有機基であるか、またはR2とR3は両者合して縮合環を形成するか、もしくはR3とR4は両者合して2価の有機基を表す。ただし、R3とR4が共に水素原子であることはない。]

で示される化合物。

(23) 式(I)において、R1がフェニル基、R2がメチル基、R3とR4が合して3-ヒドロキシ-5-ヒドロキシメチル-2-メチルピリジン-4-イルメチレン基である、上記(22)項記載の化合物。

(24) 式(II)において、R1がフェニル基、R2がメチル基、R3が6-メチル-1, 3-ジヒドロプロ[3, 4-c]ピリジン-7-オール基である、上記(22)項記載の化合物。

(25) 蛋白修飾物生成抑制剤の製造における上記(21)～(24)項のいずれか記載

の化合物の使用。

(26) 蛋白修飾物生成により仲介される疾患の処置方法であって、当該処置を必要としている対象に、治療上有効量の上記(21)～(24)項のいずれか記載の化合物を投与することを含んでなる方法。

[0043] ここに「蛋白修飾物」とは、非酵素的条件下にカルボニル化合物と反応することによって生じる蛋白修飾物(たとえばAGEs、ALEsなど)をいい、特記しない限りAGEsとALEsの両者を含むものとする。蛋白修飾物は、AGEs、ALEsまたはこれらの組合せであってもよく、AGEsには、たとえばペントシジン、クロスリン、X1(フルオロリンク)、ピロピリジン、ピラリン、カルボキシメチルリジン、イミダゾロン化合物、カルボキシエチルリジン、MGOダイマー、GOダイマー、イミダゾリジン、アルグピリミジンなどが含まれ、ALEsには、たとえばマロンジアルデヒドリジン、ヒドロキシノネナール修飾物などが含まれる。

[0044] 「カルボニル化合物」とは、生体由来または非生体由来に関係なく、蛋白修飾の原因となるカルボニル基を有する化合物であればよく、ジカルボニル化合物も含まれる。従って、カルボニル化合物の具体例としては、アラビノース、GO、MGO、3-DG、グリコールアルデヒド、デヒドロアスコルビン酸、ヒドロキシノネナール、マロンジアルデヒド、アクロレイン、5-ヒドロキシメチルフルフラール、ホルムアルデヒド、アセトアルデヒド、レプリン酸、フルフラールなどを挙げることができる。

[0045] 「ビタミンB6欠乏症」とは、ビタミンB6の欠乏に基因する諸疾患をいい、口角炎、口内炎、舌炎、口唇炎、急性および慢性湿疹、接触性皮膚炎、末梢神経炎、貧血、リンパ球減少症、神経障害などが例示される。「ビタミンB6(分子)」には、ピリドキシン、ピロドキサール、ピロドキサミンや、それらのリン酸エステルが包含される。

[0046] 「蛋白修飾物生成抑制剤」の有効成分である、遊離形または塩形の1-置換または非置換-3-置換または非置換-2-ピラゾリン-5-オン化合物の4位に、ビタミンB6分子の結合を妨げる置換基(ビタミンB6分子自体に由来するものを含む)を導入した構造を有する化合物または当該化合物の転位体は、in vivo、ex vivoまたは／およびin vitroに拘わらず、蛋白修飾物の生成を結果的に抑制することができる。「結果的に抑制する」とは、カルボニル化合物をトラップする作用を有することによるもので

あってもよく、蛋白修飾物を生成する反応を抑制することによるものであってもよく、最終的に蛋白修飾物の生成を抑制すればよく、その作用機序には限定されない。なお、「抑制剤」または「保護剤」の語には、予防または／および治療のために使用する薬剤が包含される。

[0047] 本発明にかかる蛋白修飾物生成抑制剤の有効成分として使用される化合物は、前記式(I)または(II)で表わすことができるものである。

[0048] 式(I)または(II)において、R1は、水素原子または置換または非置換の芳香環(異項環を含む。)基を表わす。「芳香環基」には、20個を越えることのない環構成原子数(そのなかに酸素、硫黄、窒素などのヘテロ原子が存在してもよいが、それらの数が4個を越えることはない)を有するものが包含され、特に環構成炭素原子数6〜10個を有するアリール(たとえばフェニル、ナフチル)が好ましい。

[0049] 置換基としては、低級アルキル、低級アルケニル、低級アルコキシ、低級アルケニルオキシ、低級アルカノイル、ハロ(低級)アルキル、カルボキシル、低級アルコキシカルボニル、カルボキシ(低級)アルキル、ハロ(たとえば塩素、臭素、ヨウ素、フッ素)、ニトロ、アミノ、低級アルキルアミノ、ジ(低級)アルキルアミノ、低級アルカノイルアミノ、ヒドロキシ、チオール、ヒドロキシルホニル、アミノスルホニル、アリール(低級)アルカノイル、アリールオキシアミノ、アリール、アリール(低級)アルキル、シクロ(低級)アルキル、シクロ(低級)アルケニル、シクロ(低級)アルキル(低級)アルキル、3〜7員ヘテロ環(たとえばオキサジアゾリル、チアジアゾリル)などの中から1種またはそれ以上が選択されてよい。置換基の数に制限はないが、通常、3個を越えることはない。

[0050] R1で表される置換または非置換の芳香環基の具体例を挙げると、次のとおりである:フェニル、ナフチル、o-, m-またはp-低級アルキルフェニル(たとえばo-メチルフェニル、p-メチルフェニル、p-エチルフェニル)、o-, m-またはp-低級アルコキシフェニル(たとえばo-, m-またはp-メトキシフェニル、o-, m-またはp-エトキシフェニル)、o-, m-またはp-アミノフェニル、o-, m-またはp-ニトロフェニル、o-, m-またはp-ハロフェニル(たとえばo-, m-またはp-クロロフェニル、o-, m-またはp-フルオロフェニル)、o-, m-またはp-ハロ(低級)アルキルフェニル(たとえばo-, m-またはp-トリフルオロメチルフェニル)、o-, m-またはp-スルファモイルフェニル、o-

ー, mーまたはpーカルボキシフェニル、oー, mーまたはpー低級アルコキシカルボニルフェニル(たとえばoー, mーまたはpーメトキシカルボニルフェニル、oー, mーまたはpーエトキシカルボニルフェニル、oー, mーまたはpーイソプロポキシカルボニルフェニル)、oー, mーまたはpー低級アルカノイルフェニル(たとえばoー, mーまたはpーアセチルフェニル)、ジ(低級)アルキルフェニル(たとえば3, 4ージメチルフェニル)、ジヒドロキシフェニル(たとえば2, 4ージヒドロキシフェニル)、2ーアミノー4ーカルボキシフェニル、3ーアミノー5ーカルボキシフェニル、3ー低級アルコキシー4ーヒドロキシフェニル(たとえば3ーメトキシー4ーヒドロキシフェニル)、3ーカルボキシー4ーハロフェニル(たとえば3ーカルボキシー4ークロロフェニル)など。

[0051] R2、R3およびR4は、それぞれ独立して、水素原子または1価の有機基を表わす。「1価の有機基」には、置換または非置換の炭化水素基、ハロ基、ニトロ基、アミノ基、ヒドロキシ基、チオール基、カルボキシ基、カルボキシ(低級)アルキル基、低級アルコキシカルボニル基、ホルミル基、低級アルカノイル基、低級アルキルアミノ基、ジ(低級)アルキルアミノ基、低級アルカノイルアミノ基、アリール(低級)アルカノイル基、アリールオキシアミノ基、スルホン酸基、3ー7員ヘテロ環基などが包含される。「炭化水素基」には、炭素数30個を越えない(好ましくは8個を越えない)鎖状または環状の、脂肪族、脂環式または芳香族炭化水素基が包含され、具体的にはアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、シクロアルケニル基、アリール基などが例示される。「3ー7員ヘテロ環基」は、環構成原子として3個を越えないヘテロ原子を含むものであり、たとえばピロリジノ、ピペリジノ、モルホリノ、チアモルホリノなどが挙げられる。置換基の種類と数は、R1について説明したのと同様である。ただし、R3とR4が共に水素原子であることはない。

[0052] また、R2とR3は、両者合して縮合環を形成することができる。当該縮合環は、5または6員飽和炭素環(すなわち、R2+R3＝トリメチレンまたはテトラメチレン)が好ましく、置換基が存在していてもよい。なおまた、R3とR4は、両者合して2価の有機基を表わすことができる。当該2価の有機基としては、たとえばメチレンタイプのものとスピロタイプのものを挙げることができる。メチレンタイプのものとしては、フェニルメチレン、フェニルアルケニルメチレン、キノリニルメチレン、フラニルメチレン、ジアゾリルメ

チレン、アミノメチレン、ジ(低級)アルキルアミノメチレン、ピリジルメチレン、チオフェニルメチレンなどが例示され、それらは、適宜、置換基を有していてもよい。これら縮合環や2価の有機基に存在する置換基の種類と数は、R1の場合と同様であってよい。

[0053] なお、上記において、アルキル、アルコキシ、アルカノイルなどの語に関連して使用された「低級」なる言葉は、通常、炭素数8個まで、好ましくは炭素数5個までの基を指称するものとして使用される。

[0054] 本発明の化合物(I)または(II)の具体例を挙げれば、次のとおりである：

1. 2-(3-アミノ-5-オキソ-1-フェニル-4, 5-ヒドロ-1H-ピラゾール-4-イル)-2-オキソ-N-フェニル-アセトアミド；
2. 2-(3-アミノ-5-オキソ-1-フェニル-4, 5-ヒドロ-1H-ピラゾール-4-イル)-2-オキソ-N-チアゾール-2-イル-アセトアミド；
3. 2-(3-アミノ-5-オキソ-1-フェニル-4, 5-ヒドロ-1H-ピラゾール-4-イル)-2-オキソ-アセトアミド；
4. 2-(3-アミノ-5-オキソ-1-フェニル-4, 5-ヒドロ-1H-ピラゾール-4-イル)-N-(3, 4-ジメチル-フェニル)-4-オキソ-ブチルアミド；
5. 2-(4-アミノ-フェニル)-4-(2-ヒドロキシ-エチル)-5-メチル-2, 4-ヒドロ-ピラゾール-3-オン；

- [0055]
6. 5-アミノ-2-フェニル-4-(1-フェニル-1H-テトラゾール-5-イルスルファニル)-2, 4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン；
  7. 3-(3-メチル-5-オキソ-1-ペニル-4, 5-ジヒドロ-1H-ピラゾール-4-イル)-プロピオン酸；
  8. N-(3-メチル-5-オキソ-1-フェニル-4, 5-ジヒドロ-1H-ピラゾール-4-イル)-アセトアミド；
  9. 4-[(5-ヒドロキシ-3-メチル-1-フェニル-1H-ピラゾール-4-イル)-フェニル-メチル]-5-メチル-2-フェニル-2, 4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン；
  10. 2-フェニル-3a, 4, 5, 6-テトラヒドロ-2H-シクロペンタピラゾール-3-オン；

- [0056]
11. 4-メチル-N-(3-メチル-5-オキソ-1-フェニル-4, 5-ジヒドロ-1H-ピラゾ



ール-4-イル)-ベンゼンスルホンアミド;

12. N-(3-メチル-5-オキソ-1-フェニル-4, 5-ジヒドロ-1H-ピラゾール-4-イル)-アセトアミド;

13. 5-メチル-2-(3-ニトロ-フェニル)-4-(1-フェニル-1H-テトラゾール-5-イルスルファニル)-2, 4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン;

14. N-[5-オキソ-1-フェニル-4-(1-フェニル-1H-テトラゾール-5-イルスルファニル)-4, 5-ジヒドロ-1H-ピラゾール-3-イル]-ベンズアミド;

15. 4-(ヒドロキシ-フェニル-メチル)-2-フェニル-5-トリフルオロメチル-2, 4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン;

[0057] 16. 4-(1-ヒドロキシイミノ-エチル)-2, 5-ジフェニル-2, 4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン;

17. 5, 5'-ジメチル-2, 2'-ジフェニル-2, 4, 2', 4'-テトラヒドロ-[4, 4']ビピラゾール-3, 3'-ジオン;

18. 2-(4-クロロ-フェニル)-4-エチル-5-メチル-2, 4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン;

19. 4-[4-(4-メトキシ-フェニル)-チアゾール-2-イルスルファニル]-5-メチル-5-フェニル-2, 4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン;

20. 4-(2-オキソ-2-フェニル-エチル)-2-フェニル-5-プロピル-2, 4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン;

[0058] 21. 5-メチル-2-フェニル-4-(4-p-トルイル-チアゾール-2-イルスルファニル)-2, 4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン;

22. 2-(4-フルオロ-フェニル)-4-[[1-(4-フルオロ-フェニル)-5-ヒドロキシ-3-メチル-1H-ピラゾール-4-イル]-(2-ヒドロキシ-フェニル)-メチル]-5-メチル-2, 4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン;

23. N-(3, 4-ジメチル-フェニル)-2-(3-メチル-5-オキソ-1-フェニル-4, 5-ジヒドロ-1H-ピラゾール-4-イル)-2-オキソ-アセトアミド;

24. 5-(4-クロロ-ベンゾイル)-4, 4-ジヒドロキシ-2-フェニル-2, 4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン;

25. ソジウム;4-ヒドロキシ-3-メチル-5-オキソ-1-フェニル-4, 5-ジヒドロ-1H-ピラゾール-4-スルホン酸ナトリウム;
- [0059] 26. 5-メチル-4, 4-ジ-モルホリン-4-イル-2-フェニル-2, 4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン;
27. 3-ベンゾイルアミノ-4-ヒドロキシ-5-オキソ-1-フェニル-4, 5-ジヒドロ-1H-ピラゾール-4-スルホン酸ナトリウム;
28. 3-メチル-1-フェニル-5-オキソ-4-スピロ(3オキソ-2, 3-ジヒドロ-ベンゾ[b]チオフェン-2-イル)-4, 5-ジヒドロ-1H-ピラゾール;
29. 4, 4, 5-トリメチル-2-フェニル-2, 4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン;
30. 4, 10-ジメチル-2, 8, 11-トリフェニル-2, 3, 8, 9-テトラザ-ジスピロ[4. 0. 4. 1]ウンデカ-3, 9-ジエン-1, 7-ジオン;
- [0060] 31. 2-(2-クロロ-フェニル)-4-(3-エトキシ-4-ヒドロキシ-ベンジリデン)-5-メチル-2, 4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン;
32. 2-(2-クロロ-フェニル)-4-(4-ジメチルアミノ-ベンジリデン)-5-メチル-2, 4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン;
33. 5-メチル-4-(3-フェニル-アリリデン)-2-(3-トリフルオロメチル-フェニル)-2, 4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン;
34. 3-{5-[3-メチル-5-オキソ-1-(4-スルファモイル-フェニル)-1, 5-ジヒドロ-ピラゾール-4-イリデンメチル]-フラン-2-イル}-安息香酸;
35. 4-(4-ジメチルアミノ-ベンジリデン)-2-(3-フルオロ-フェニル)-5-メチル-2, 4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン;
- [0061] 36. 3-{4-[4-(3-クロロ-4, 5-ジヒドロ-ピラゾール-1-イル)-ベンジリデン]-3-メチル-5-オキソ-4, 5-ジヒドロ-ピラゾール-1-イル}-安息香酸;
37. 3-[4-(2-ヒドロキシ-ベンジリデン)-5-オキソ-3-フェニル-4, 5-ジヒドロ-ピラゾール-1-イル]-安息香酸;
38. 3-[1-(3-クロロ-フェニル)-3-メチル-5-オキソ-1, 5-ジヒドロ-ピラゾール-4-イリデンメチル]-1H-キノリン-2-オン;
39. 3-{5-[3-メチル-5-オキソ-1-(4-スルファモイル-フェニル)-1, 5-ジヒド

- ロ-ピラゾール-4-イリデンメチル]-フラン-2-イル}-安息香酸メチル;
40. 4-(4-ベンゾ[1, 3]ジオキソール-5-イルメチレン-3-メチル-5-オキソ-4, 5-ジヒドロ-ピラゾール-1-イル)-安息香酸メチル;
- [0062] 41. 4-{3-メチル-5-オキソ-4-[5-(4-スルファモイル-フェニル)-フラン-2-イルメチレン]-4, 5-ジヒドロ-ピラゾール-1-イル}-安息香酸メチル;
42. 2-(4-クロロ-フェニル)-4-(2, 4-ジヒドロキシ-ベンジリデン)-5-メチル-2, 4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン;
43. 2-(4-クロロ-フェニル)-4-(3-ヒドロキシ-ベンジリデン)-5-メチル-2, 4-ジヒドロピラゾール-3-オン;
44. 4-(3, 4-ジヒドロキシ-ベンジリデン)-5-メチル-2-p-トルイル-2, 4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン;
45. 3-[1-(4-アセチル-フェニル)-3-メチル-5-オキソ-1, 5-ジヒドロ-ピラゾール-4-イリデン]-1, 3-ジヒドロ-インドール-2-オン;
- [0063] 46. 2-(4-フルオロ-フェニル)-4-(5-ヒドロキシ-3-メチル-1-o-トルイル-1H-ピラゾール-4-イルメチレン)-5-メチル-2, 4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン;
47. 2-(4-クロロ-フェニル)-4-(4-ヒドロキシ-3-メトキシ-ベンジリデン)-5-トリフルオロメチル-2, 4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン;
48. 2-(4-エチル-フェニル)-4-(4-ヒドロキシ-ベンジリデン)-5-メチル-2, 4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン;
49. 4-[4-(4-ヒドロキシ-ベンジリデン)-3-メチル-5-オキソ-4, 5-ジヒドロ-ピラゾール-1-イル]-ベンゼンスルホンアミド;
50. 4-(5-オキソ-4-チオフエン-2-イルメチレン-3-トリフルオロメチル-4, 5-ジヒドロ-ピラゾール-1-イル)-安息香酸エチル;
- [0064] 51. 4-[4-(4-ジメチルアミノ-ベンジリデン)-5-オキソ-3-トリフルオロメチル-4, 5-ジヒドロ-ピラゾール-1-イル]-ベンゼンスルホンアミド;
52. 4-イソプロピリデン-5-メチル-2-フェニル-2, 4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン;
53. 4-(4-ヒドロキシ-ベンジリデン)-2-フェニル-5-トリフルオロメチル-2, 4-ジ

ヒドロ-ピラゾール-3-オン;

54. 4-(2, 4-ジヒドロキシ-ベンジリデン)-2-(3, 4-ジメチル-フェニル)-5-メチル-2, 4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン;

55. 3-[4-(3-エトキシ-4-ヒドロキシ-ベンジリデン)-3-メチル-5-オキソ-4, 5-ジヒドロ-ピラゾール-1-イル]-安息香酸;

[0065] 56. 4-[4-(3, 5-ジ tert-ブチル-4-ヒドロキシ-ベンジリデン)-3-メチル-5-オキソ-4, 5-ジヒドロ-ピラゾール-1-イル]-安息香酸;

57. 3-[3-(4-ヒドロキシ-3-メトキシ-ベンジリデン)-3-メチル-5-オキソ-4, 5-ジヒドロ-ピラゾール-1-イル]-安息香酸;

58. 3-[3-ヒドロキシ-4-(4-ヒドロキシ-3-メトキシ-ベンジリデン)-5-オキソ-ピラゾリジン-1-イル]-安息香酸;

59. 4-(3-ヒドロキシ-2, 4-ジメトキシ-ベンジリデン)-5-メチル-2-フェニル-2, 4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン;

60. 4-[4-(4-ヒドロキシ-3-メトキシ-ベンジリデン)-3-メチル-5-オキソ-ピラゾリジン-1-イル]-安息香酸イソプロピル;

[0066] 61. 2-クロロ-5-[4-(2-クロロ-4-ヒドロキシ-5-メトキシ-ベンジリデン)-3-メチル-5-オキソ-4, 5-ジヒドロ-ピラゾール-1-イル]-安息香酸;

62. 4-[4-(4-ヒドロキシ-ベンジリデン)-3-メチル-5-オキソ-4, 5-ジヒドロ-ピラゾール-1-イル]-安息香酸エチル;

63. 4-[4-(4-ヒドロキシ-ベンジリデン)-5-オキソ-3-トリフルオロメチル-4, 5-ジヒドロ-ピラゾール-1-イル]-安息香酸エチル;

64. 4-[4-(4-ヒドロキシ-ベンジリデン)-3-メチル-5-オキソ-4, 5-ジヒドロ-ピラゾール-1-イル]-安息香酸;

65. 4-ジメチルアミノメチレン-5-メチル-2-フェニル-2, 4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン;

[0067] 66. 4-(5-ヒドロキシ-3-メチル-1-フェニル-1H-ピラゾール-4-イルメチレン)-5-メチル-2-フェニル-2, 4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン;

67. 4-(4-クロロ-ベンジリデン)-5-メチル-2-フェニル-2, 4-ジヒドロ-ピラゾール-

ル-3-オン;

68. 1-(5-ヒドロキシ-3-メチル-1-フェニル-1H-ピラゾール-4-イル)-6-メチル-1, 3-ジヒドロフロ[3, 4-c]ピリジン-7-オール;

69. 1-(5-ヒドロキシ-3-メチル-1-フェニル-1H-ピラゾール-4-イル)-6-メチル-1, 3-ジヒドロフロ[3, 4-c]ピリジン-7-オール(塩酸塩);

70. 4-(4-ヒドロキシ-ベンジリデン)-5-メチル-2-フェニル-2, 4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン;

[0068] 71. 2-(3-クロロ-フェニル)-4-(4-ヒドロキシ-ベンジリデン)-5-メチル-2, 4-ジヒドロピラゾール-3-オン;

72. 4-(4-ベンジルオキシ-ベンジリデン)-5-メチル-2-フェニル-2, 4-ジヒドロピラゾール-3-オン;

73. 2-(3-クロロ-フェニル)-5-メチル-2H-ピラゾール-3, 4-ジオン 4-オキシム;

74. 5-(5-オキソ-1, 3-ジフェニル-1, 5-ジヒドロ-ピラゾール-4-イリデン)-4-フェニル-4, 5-ジヒドロ-[1, 3, 4]チアゾール-2-カルボン酸エチル;

75. 4-[1, 3]ジチオラン-2-イリデン-5-メチル-2-フェニル-2, 4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン;

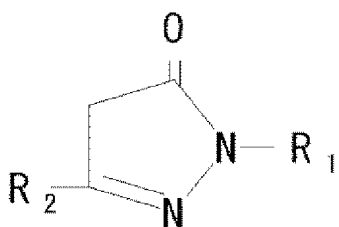
[0069] 76. 5-(4-クロロ-フェニルスルファニルメチル)-2-フェニル-4-[N'-(3-トリフルオロメチル-フェニル)-ヒドラジノ]-2, 4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン;

77. 4-(5-ベンゾイル-3-フェニル-3H-[1, 3, 4]チアジアゾール-2-イリデン)-2, 5-ジフェニル-2, 4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン;

78. フォスフォリックアシッド モノ-[5-ヒドロキシ-6-メチル-4-(3-メチル-5-オキソ-1-フェニル-1, 5-ジヒドロ-ピラゾール-4-イリデンメチル)-ピリジン-3-イルメチル]エステルなど。

[0070] 上記本発明目的化合物(I)を製造するには、一般に、次式で表わされる1-置換または非置換-3-置換または非置換-2-ピラゾリン-5-オン(III)を、4位に導入すべき置換基の種類に応じて、適宜、自体公知の化学反応に付すればよい:

[化7]



[式中、R1は水素原子または置換または非置換の芳香環基であり、R2は水素原子または1価の有機基である。]。

[0071] たとえば、化合物(III)と式:R3-CHO(IV)で示されるアルデヒドとを反応させることによって、化合物(I)を製造することができる。また、化合物(I)は、分子内転位を生じさせ、化合物(II)として取得することも可能である。通常、化合物(III)とアルデヒド(IV)を、水性媒体中、アルカリ条件下、または有機溶媒(たとえばテトラヒドロフラン、ジオキサン)中、有機または無機塩基の存在下、-20-100℃で処理することによって実施することができる。

[0072] 出発物質である化合物(III)は、それ自体、公知であるか、または、自体常套の化学反応を利用して製造することができる。たとえば、化合物(III)におけるR1がフェニル、R2がメチルである3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オンは、一般名をエダラボン(edaravone)と称し、フリーラジカル消去作用を有しており、脳機能正常化剤(特公平5-31523号公報)、過酸化脂質生成抑制剤(特公平5-35128号公報)、抗潰瘍剤(特許第2906512号公報)、血糖上昇抑制剤(特許第2906513号公報)などの薬剤として有用であることが知られている。ただし、エダラボンが、カルボニル化合物をトラップし、カルボニルストレス状態を改善して、カルボニルストレス下で発生する種々の病態の予防または治療に有効であること、すなわち蛋白修飾物生成抑制剤としての有用であることは、特願2003-076955号明細書で開示される以前には、知られていなかった。

[0073] 上記したとおり、化合物(I)または(II)は、生体内において、副作用としてのビタミンB6欠乏症を示すことなく、それ自体で蛋白修飾物生成抑制作用を示すものである。この事実は、次の試験によって確認することができる:

[0074] (A)化合物(I)がそれ自体で蛋白修飾物生成抑制作用を示す事実を証明する試験:-

(1) 代表的なAGEsであるペントシジンを指標として、非糖尿病の腎不全透析患者から血漿を採取し、本発明の化合物を添加し、一定時間後のペントシジン生成量を測定した。

(2) フェニルアラニン、ヒドロキシラジカル存在下でOHラジカルと結合し、o-またはm-チロシンを生成する。さらに、チロシンは、パーオキシナイトライト存在下でNOラジカルと反応してニトロチロシンを生成する。一方、ラジカルは生体内で腎に障害を与えることが知られている。そこで、フェニルアラニン-ラジカル反応系における本発明の化合物のラジカル捕捉能を検証した。

[0075] (B) 化合物(I)がビタミンB6欠乏症を惹起しないことを証明する試験:

(1) ビタミンB6溶液に本発明の化合物を加え、一定時間後のビタミンB6残存量を測定した。

(2) 正常ラットに本発明の化合物を投与し、一定期間後のビタミンB6欠乏症発症の有無を確認した。

[0076] 化合物(I)または(II)を有効成分として含有する本発明の蛋白修飾物生成抑制剤は、以下に例示する病態の予防および／または治療に有用である: 腎障害、糖尿病合併症(腎症、神経障害、網膜症、白内障など)、動脈硬化、透析合併症である透析アミロイドーシス、腹膜透析患者における腹膜硬化症、中枢神経疾患であるアルツハイマー病、ピック病およびパーキンソン病、リウマチ性関節炎、日光弾性線維症、老化など。当該抑制剤は、特に腎障害、予防および／または治療するのに有用である。

[0077] 予防剤または治療剤として用いる場合、化合物(I)または(II)を、そのままあるいは水に希釈する等の各種処理を施して使用することができ、医薬品、医薬部外品等に配合して使用することができる。この場合の配合量は、病態や製品に応じて適宜選択されるが、通常全身投与製剤の場合には、0.001〜50重量%、特に0.01〜10重量%とすることができ、0.001重量%より少ないと満足する予防または治療作用が認められない可能性があり、また、5重量%を越えると製品そのものの安定性や香味等の特性が損なわれる可能性があるので好ましくない。

[0078] 化合物(I)または(II)は、遊離形または塩形で製剤中に含有されてよい。塩形とし

ては、通常、薬剤学的に許容されているもの、たとえば無機塩基や有機塩基との塩、無機酸、有機酸、塩基性または酸性アミノ酸などの酸付加塩などが挙げられる。無機塩基との塩としては、たとえばアルカリ金属(ナトリウム、カリウムなど)塩、アルカリ土類金属(カルシウム、マグネシウムなど)塩、アルミニウム塩、アンモニウム塩などが挙げられる。有機塩基との塩としては、たとえば第1級アミン(エタノールアミンなど)、第2級アミン(ジエチルアミン、ジエタノールアミン、ジシクロヘキシルアミン、N, N'-ジベンジルエチレンジアミンなど)、第3級アミン(トリメチルアミン、トリエチルアミン、ピリジン、ピコリン、トリエタノールアミンなど)との塩が挙げられる。

[0079] 無機酸との塩としては、塩酸、臭化水素酸、硝酸、硫酸、リン酸などとの塩が例示され、有機酸との塩としては、ギ酸、酢酸、乳酸、トリフルオロ酢酸、フマル酸、シュウ酸、酒石酸、マレイン酸、安息香酸、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸などとの塩が例示される。さらに、塩基性アミノ酸との塩としては、アルギニン、リジン、オルニチンなどとの塩が例示され、酸性アミノ酸との塩としては、アスパラギン酸、グルタミン酸などとの塩が例示される。

[0080] 化合物(I)または(II)は、必要に応じて、アミノグアニジン、ピリドキサミン誘導体、OPB-9195、ビッグアニド化合物、架橋形成阻害薬、アマドリ化合物を分解する酵素、GSH、システイン、アセチルシステイン、ビタミンE、ユビキノール、アルドース還元酵素阻害薬、カルボニル化合物トラップ剤など、公知の薬物と共に使用されてもよく、これにより蛋白修飾物生成抑制作用の持続性を高めることができる。また、化合物(I)または(II)を失活化または分解する物質を同定し、これを阻害する物質を選択し、これを併用あるいは配合し、組成物中の有効成分の安定化を図ることができる。

[0081] 本発明の薬剤の投与方法として、経口投与や静脈内投与以外に、経粘膜投与、経皮投与、筋肉内投与、皮下投与、直腸内投与などが適宜選択でき、その投与方法に応じて、種々の製剤として用いることができる。以下に、各製剤について記載するが、本発明において用いられる剤型はこれらに限定されるものではなく、医薬製剤分野において通常用いられる各種製剤として用いることができる。

[0082] 蛋白修飾物が関与する病態に対する予防薬または治療薬として用いる場合には、



化合物(I)または(II)の経口投与量は、一般的に0.03mg/kg〜100mg/kgの範囲が好ましく、より好ましくは0.1mg/kg〜50mg/kgである。全身投与を行う場合、特に静脈内投与の場合には老若男女または体型等により変動があるが、通常、有効血中濃度が0.2 $\mu$ g/mL〜20 $\mu$ g/mL、より好ましくは0.5 $\mu$ g/mL〜10 $\mu$ g/mLの範囲となるように投与する。

[0083] 経口投与を行う場合の剤型として、散剤、顆粒剤、カプセル剤、丸剤、錠剤、エリキシル剤、懸濁剤、乳剤、シロップ剤などがあり、適宜選択することができる。また、口腔内局所投与を行う場合の剤型として、咀嚼剤、舌下剤、バツカル剤、トローチ剤、軟膏剤、貼布剤、液剤などがあり、適宜選択することができる。なお、上記製剤について徐放化、安定化、易崩壊化、難崩壊化、腸溶性化、易吸収化等の修飾を施してもよい。

[0084] 上記の各剤型について、公知のドラッグデリバリーシステム(DDS)の技術を採用することができる。本明細書に言うDDS製剤とは、徐放化製剤、局所適用製剤(トローチ、バツカル錠、舌下錠など)、薬物放出制御製剤、腸溶性製剤、胃溶性製剤などのような、投与経路、バイオアベイラビリティ、副作用などを勘案して、最適の製剤形態にした製剤をいう。

[0085] DDSの構成要素には、基本的に薬物、薬物放出モジュール、被包体および治療プログラムが含まれ、各々の構成要素について、特に放出を停止させた時に速やかに血中濃度が低下する半減期の短い薬物が好ましく、投与部位の生体組織と反応しない被包体が好ましく、さらに、設定された期間において最良の薬物濃度を維持する治療プログラムを有するのが好ましい。薬物放出モジュールは、基本的に薬物貯蔵庫、放出制御部、エネルギー源および放出孔または放出表面を有している。これら基本的構成要素は全て揃っている必要はなく、適宜追加あるいは削除等を行い、最良の形態を選択することができる。

[0086] DDSに使用できる材料としては、高分子、シクロデキストリン誘導体、レシチンなどがある。高分子には不溶性高分子(シリコン、エチレン・酢酸ビニル共重合体、エチレン・ビニルアルコール共重合体、エチルセルロース、セルロースアセテートなど)、水溶性高分子およびヒドロキシルゲル形成高分子(ポリアクリルアミド、ポリヒドロキシ

エチルメタクリレート架橋体、ポリアクリル架橋体、ポリビニルアルコール、ポリエチレンオキシド、水溶性セルロース誘導体、架橋ポロキサマー、キチン、キトサンなど)、徐溶解性高分子(エチルセルロース、メチルビニルエーテル・無水マレイン酸共重合体の部分エステルなど)、胃溶性高分子(ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、カルメロースナトリウム、マクロゴール、ポリビニルピロリドン、メタアクリル酸ジメチルアミノエチル・メタアクリル酸メチルコポリマーなど)、腸溶性高分子(ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート、酢酸フタルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースアセテートサクシネート、カルボキシメチルエチルセルロース、アクリル酸系ポリマーなど)、生分解性高分子(熱凝固または架橋アルブミン、架橋ゼラチン、コラーゲン、フィブリン、ポリシアノアクリレート、ポリグリコール酸、ポリ乳酸、ポリ $\beta$ ヒドロキシ酢酸、ポリカプロラクトンなど)があり、剤型によって適宜選択することができる。

[0087] 特に、シリコン、エチレン・酢酸ビニル共重合体、エチレンービニルアルコール共重合体およびメチルビニルエーテル・無水マレイン酸共重合体の部分エステルは薬物の放出制御に使用でき、セルロースアセテートは浸透圧ポンプの材料として使用でき、エチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロースおよびメチルセルロースは、徐放性製剤の膜素材として使用でき、ポリアクリル架橋体は口腔粘膜あるいは眼粘膜付着剤として使用できる。

[0088] また、製剤中には、その剤形(経口投与剤、注射剤、座剤など)に応じて、溶剤、賦形剤、コーティング剤、基剤、結合剤、滑沢剤、崩壊剤、溶解補助剤、懸濁化剤、粘稠剤、乳化剤、安定剤、緩衝剤、等張化剤、無痛化剤、保存剤、矯味剤、芳香剤、着色剤など適宜の添加剤を配合して製造することができる。これら各添加剤について、以下にそれぞれの具体例を挙げるが、これらに特に限定されるものではない。

[0089] 溶剤としては、精製水、注射用水、生理食塩液、ラッカセイ油、エタノール、グリセリンなどを挙げるることができる。賦形剤としては、デンプン類、乳糖、ブドウ糖、白糖、結晶セルロース、硫酸カルシウム、炭酸カルシウム、タルク、酸化チタン、トレハロース、キシリトールなどを挙げるることができる。コーティング剤としては、白糖、ゼラチン、酢酸フタル酸セルロースおよび上記記載した高分子などを挙げるることができる。基剤として

は、ワセリン、植物油、マクロゴール、水中油型乳剤性基剤、油中水型乳剤性基剤などを挙げることができる。

[0090] 結合剤としては、デンプンおよびその誘導体、セルロースおよびその誘導体、ゼラチン、アルギン酸ナトリウム、トラガント、アラビアゴムなどの天然高分子化合物、ポリビニルピロリドンなどの合成高分子化合物、デキストリン、ヒドロキシプロピルスターチなどを挙げることができる。滑沢剤としては、ステアリン酸およびその塩類、タルク、ワックス類、小麦デンプン、マクロゴール、水素添加植物油、ショ糖脂肪酸エステル、ポリエチレングリコールなどを挙げることができる。崩壊剤としては、デンプンおよびその誘導体、寒天、ゼラチン末、炭酸水素ナトリウム、セルロースおよびその誘導体、カルメロースカルシウム、ヒドロキシプロピルスターチ、カルボキシメチルセルロースおよびその塩類ならびにその架橋体、低置換型ヒドロキシプロピルセルロースなどを挙げるができる。

[0091] 溶解補助剤としては、シクロデキストリン、エタノール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなどが挙げられる。懸濁化剤としては、アラビアゴム、トラガント、アルギン酸ナトリウム、モノステアリン酸アルミニウム、クエン酸、各種界面活性剤などが挙げられる。粘稠剤としては、カルメロースナトリウム、ポリビニルピロリドン、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルアルコール、トラガント、アラビアゴム、アルギン酸ナトリウムなどが挙げられる。乳化剤としては、アラビアゴム、コレステロール、トラガント、メチルセルロース、各種界面活性剤、レシチンなどが挙げられる。

[0092] 安定剤としては、亜硫酸水素ナトリウム、アスコルビン酸、トコフェロール、キレート剤、不活性ガス、還元性物質などがある。緩衝剤としては、リン酸水素ナトリウム、酢酸ナトリウム、ホウ酸などがある。等張化剤としては、塩化ナトリウム、ブドウ糖などがある。無痛化剤としては、塩酸プロカイン、リドカイン、ベンジルアルコールなどがある。保存剤としては、安息香酸およびその塩類、パラオキシ安息香酸エステル類、クロロブタノール、逆性石けん、ベンジルアルコール、フェノール、チロメサールなどがある。矯味剤としては、白糖、サッカリン、カンゾウエキス、ソルビトール、キシリトール、グリセリンなどがある。芳香剤としては、トウヒチンキ、ローズ油などがある。着色剤としては、

水溶性食用色素、レーキ色素などがある。

- [0093] 上記したように、医薬品を徐放化製剤、腸溶性製剤または薬物放出制御製剤のようなDDS製剤化することにより、薬物の有効血中濃度の持続化、バイオアベイラビリティの向上などの効果が期待できる。しかし、化合物(I)または(II)は生体内で失活化または分解され、その結果、所望の効果が低下または消失する可能性がある。従って、化合物(I)または(II)を失活化または分解する物質を阻害する物質を本発明の蛋白修飾物に關与する病態の予防または治療組成物と併用することにより、成分の効果をさらに持続化させ得る。これらは製剤中に配合してもよく、または別々に投与してもよい。当業者は適切に、化合物(I)または(II)を失活化または分解する物質を同定し、これを阻害する物質を選択し、配合あるいは併用することができる。
- [0094] 製剤中には、上記以外の添加物として通常の組成物に使用されている成分を用いることができ、これらの成分の添加量は、本発明の効果を妨げない範囲で通常量とすることができる。
- [0095] 化合物(I)または(II)は、また、腹膜透析や血液透析における蛋白修飾物質による障害を抑制するために使用することができる。すなわち、蛋白修飾物生成抑制剤としての化合物(I)または(II)を、常套の腹膜透析液や血液透析液中に配合すればよい。
- [0096] 本発明による液体試料中のカルボニル化合物含有量を低減させる方法は、蛋白修飾物生成抑制剤としての化合物(I)または(II)と当該液体試料とを接触させる工程を含むものである。
- [0097] また、本発明の蛋白修飾物の生成抑制方法は、蛋白修飾物生成抑制剤としての化合物(I)または(II)を、患者血液または腹膜透析液と接触させる工程を含むものである。透析における蛋白修飾物としては、腹膜透析または血液透析を受ける患者に由来するカルボニル化合物により生成される蛋白修飾物および腹膜透析液または血液透析液自体に由来するカルボニル化合物により生成される蛋白修飾物などが含まれる。
- [0098] 化合物(I)または(II)を添加する腹膜透析液または血液透析液の組成は、公知のものでよい。一般的な腹膜透析液は、浸透圧調節剤(グルコースなど)、緩衝剤(乳

酸、クエン酸、リンゴ酸、酢酸、ピルビン酸、コハク酸、炭酸水素ナトリウムなど)、無機塩類(ナトリウムイオン、カリウムイオン、マグネシウムイオン、カルシウムイオン、塩素イオンなど)などで構成されている。化合物(I)または(II)を添加した腹膜透析液または血液透析液は、そのまま密封して加熱滅菌することができる。そうすることによって、加熱滅菌処理時または保存時に伴う、これら主成分からの蛋白修飾物の生成を抑制することができる。

[0099] また、第一室および第二室からなる分画された容器に腹膜透析などの液を収容し、第一室に還元糖を収容し、第二室に化合物(I)または(II)を収容し、使用直前に混合しても良い。アミノ酸が含まれる場合には、当業者は適宜第三室を設ける等、最良の形態をとることができる。

[0100] 腹腔内または血管内に投与された後は、化合物(I)または(II)が蛋白修飾物の生成を抑制するため、腹膜硬化のような副作用を軽減できる。さらに、その他の病態(糖尿病合併症など)の予防・治療にも効果を発揮することが期待できる。透析液には、化合物(I)または(II)の他に、公知のアミノグアニジンなどの薬物を混合して用いることができる。また、粉末型透析剤にも応用可能である。

[0101] 適当な混注用コネクターを装備した透析回路に、化合物(I)または(II)を注入することもできる。また、化合物(I)または(II)を直接腹腔内に注入して、腹腔内で腹膜透析液と混合することもできる。また、腹膜透析液を患者へ注入する前、または腹腔内貯留中に、化合物(I)または(II)を静脈内注射することにより、蛋白修飾物の生成を効果的に抑制することもできる。

[0102] 透析液などは、適当な密閉容器に充填し、滅菌処理する。滅菌処理には高圧蒸気滅菌や熱水滅菌などの加熱滅菌が有効である。この場合、高温で有害物質を溶出せず、滅菌後も輸送に耐える強度を備えた容器を用いる。具体的には、ポリ塩化ビニル、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリエステル、エチレン酢酸ビニル共重合体などからなる可撓性プラスチックバッグが挙げられる。また、外気の影響による液の劣化を避けるために、透析液等を充填した容器をさらにガスバリアー性の高い包装材で包装しても良い。

[0103] 高圧加熱滅菌を含む加熱滅菌により滅菌処理を行う場合、用いられる化合物(I)ま

たは(II)が加熱などの処理に対して十分安定であるならば、透析液配合時に化合物(I)または(II)を予め添加してから、加熱滅菌操作を行うこともできる。用いる化合物(I)または(II)が加熱滅菌に安定でない場合は、加熱を要しない滅菌法を用いることもできる。この様な滅菌法には、たとえば濾過滅菌などがある。

[0104] たとえば、孔径0.2  $\mu$ m程度のメンブランフィルターを備えた精密濾過器を用いて濾過することにより滅菌することができる。濾過滅菌された透析液は、可撓性プラスチックバックなどの容器に充填された後、密封される。また、予め加熱滅菌した腹膜透析液などに、後で化合物(I)または(II)を添加しても良い。

[0105] 添加する時期は特に限定されない。液を滅菌後あるいは滅菌前に化合物(I)または(II)を添加しても良いし、透析直前または同時に添加しても良いし、透析液を注した後に直接腹膜に注入しても良い。

[0106] 本発明の腹膜透析液は、現行の腹膜透析液や血液透析液と同様の透析処理に利用される。すなわち、腹膜透析の場合にあつては、透析患者の腹腔内に本発明による腹膜透析液を適量注入し、腹膜を通過して生体内の低分子量成分を腹膜透析液内に移行させる。腹膜透析液は間欠的に循環させ、患者の症状に応じて透析を継続する。このとき、化合物(I)または(II)は透析液内または生体内での蛋白修飾物の生成を抑制する。クレアチニンや無機塩類、あるいは塩素イオン等の透析成分とともに、カルボニル化合物も血中や腹膜内から腹膜透析液中へ移行する。ゆえに、蛋白修飾物による生体への悪影響が減少される。

[0107] 化合物(I)または(II)は、透析液のみに使用できるのではなく、栄養輸液、電解質輸液、経腸・経管栄養剤など、あらゆる液剤に利用できる。

[0108] 本発明の化合物は、注射剤としても治療に有用に用いることが出来るが、本発明化合物の中には、溶液状態にすると直ちに分解が始まり、12時間(25℃)後には40%程度が分解してしまう化合物が含まれる。本発明者らは、これに鑑み鋭意検討した結果、安定な状態で投薬できる本発明化合物含有注射剤を見いだした。したがって、本発明により、安定な状態で投薬できる本発明含有注射剤も提供される。

#### 発明の効果

[0109] 本発明により、効果的にAGEs、ALEs等の蛋白修飾物の生成を抑制する蛋白修

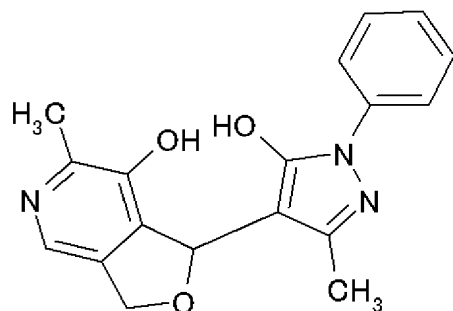
飾物生成抑制剤が提供される。特に、腎障害、腎症、神経障害、網膜症、白内障等の糖尿病合併症、動脈硬化、透析合併症である透析アミロイドーシス、腹膜透析患者における腹膜硬化症、中枢神経疾患であるアルツハイマー病、ピック病、パーキンソン病、リウマチ性関節炎、日光弾性線維症、老化等に対して、予防および／または治療用の薬剤が、本発明により提供され得る。特に、腎障害、糖尿病合併症である糖尿病性腎症において血圧降下剤の腎保護薬としての適応があるが、本発明により血圧降下作用を薬理作用として持たない、多くの患者に幅広く使用出来る腎保護薬が提供され得る。さらに、本発明の化合物が小胞体ストレス(ER stress)を抑制する点からも、本発明の化合物が糖尿病、パーキンソン病、関節リウマチなどの疾患の処置に使用できることが示される。

## 実施例

[0110] 以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

[製造例1] 1-(5-ヒドロキシ-3-メチル-1-フェニル-1H-ピラゾール-4-イル)-6-メチル-1, 3-ジヒドロプロ[3, 4-c]ピリジン-7-オールの製造

[化8]



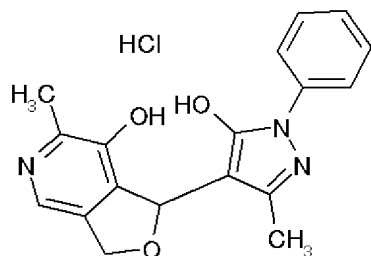
[0111] 0.1M NaOH(100mL)に3-メチル-1-フェニル-2-ピラゾリン-5-オン(1.74g)(以下、エダラボンという)を室温で攪拌しながら溶解した液に、水(100mL)にピリドキサル塩酸塩(2.44g)を溶解した液を攪拌しながら滴下して加え、反応させた。滴下終了後、約30分間攪拌し、白色沈殿の析出が終了したと思われる時点を反応終了点とし、4℃の低温室にて放冷して、沈殿物を十分に析出させた。該反応液を一夜放冷後、析出した白色沈殿物を濾取し、1-(5-ヒドロキシ-3-メチル-1-フェニル

1H-ピラゾール-4-イル)-6-メチル-1, 3-ジヒドロフロ[3, 4-c]ピリジン-7-オール

の粗生成物(wet)を(23. 7g)得た。

- [0112] 該粗生成物をメタノール(50mL)に懸濁させ、50℃で超音波攪拌器中60分間攪拌した後、溶け残った不溶物を濾過して取り除き、濾液を約10mLに濃縮後、4℃の低温室に一夜放冷して結晶を析出させた。析出した結晶を濾取し、真空デシケーター中、遮光下に乾燥して1-(5-ヒドロキシ-3-メチル-1-フェニル-1H-ピラゾール-4-イル)-6-メチル-1, 3-ジヒドロフロ[3, 4-c]ピリジン-7-オールの純粋な結晶(0. 22g)を得た。収率:6. 8%。外観性状:結晶性粉末、淡黄白色。融点:207-209℃(褐変溶融)。

- [0113] [製造例2]1-(5-ヒドロキシ-3-メチル-1-フェニル-1H-ピラゾール-4-イル)-6-メチル-1, 3-ジヒドロフロ[3, 4-c]ピリジン-7-オール塩酸塩の製造  
[化9]



- [0114] 0. 5006gの1-(5-ヒドロキシ-3-メチル-1-フェニル-1-H-ピラゾール-4-イル)-6-メチル-1, 3-ジヒドロフロ[3, 4-c]ピリジン-7-オールを150mLのメタノールに溶解し、2N塩酸メタノール1. 65mLを加えてよく攪拌した。該溶解液を約20mL程度に濃縮し、結晶が析出し始めた時点で、結晶溶媒を置換するため、50mLのエタノールを加えて濃縮し、この操作を2回繰り返してから、約5mLまで濃縮した。この濃縮液を一夜低温室(4℃)に放置し、析出した結晶を濾取し、真空デシケーター中で乾燥して、1-(5-ヒドロキシ-3-メチル-1-フェニル-1-H-ピラゾール-4-イル)-6-メチル-1, 3-ジヒドロフロ[3, 4-c]ピリジン-7-オールの一塩酸塩(0. 5011g)を得た。収率90. 0%。外観性状:結晶性粉末、淡黄白色。融点:247-249℃(褐変溶融)。

- [0115] [試験例1]ペントシジン生成抑制効果



1-(5-ヒドロキシ-3-メチル-1-フェニル-1H-ピラゾール-4-イル)-6-メチル-1, 3-ジヒドロフロ[3, 4-c]ピリジン-7-オール(以下、「TM-2002」という。)について、代表的なAGEsであるペントシジンの生成抑制効果を調べた。

[0116] 血液透析患者の透析前の血漿を同意の下に透析前に採取し、濾過滅菌した。血漿(450  $\mu$  L)にTM-2002のジメチルスルホキシド溶液(50  $\mu$  L)を加え(最終濃度: 0. 8、2. 0、5. 0mM)、37°Cで1週間インキュベートし、ペントシジンの生成量を測定した。

[0117] ペントシジンの測定は、以下のようにして行った。インキュベーション後の各試料(50  $\mu$  L)に、等容積の10%トリクロロ酢酸を加えた後、5000gで5分間遠心分離した。上清を除去後、ペレットを5%トリクロロ酢酸(300  $\mu$  L)で洗浄した。ペレットを減圧下乾燥後、窒素雰囲気下で6N HCl溶液(100  $\mu$  L)中にて、110°Cで16時間加水分解を行った。次いで酸加水分解物に5N NaOH(100  $\mu$  L)および0. 5Mリン酸緩衝液(pH7. 4)(200  $\mu$  L)を添加した後、0. 5  $\mu$  m孔のポアフィルタを通して濾過し、PBSで希釈した。遊離したペントシジンの濃度は、蛍光検出器(RF-10A、島津製作所)を用いた逆相HPLCを用いて測定した(Miyata, T. et al. ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 93, p. 2353-2358, 1996)。流出液を335/385nmの励起/発光波長でモニターした。合成ペントシジンを標準物質として使用した。ペントシジンの検出限界は、0. 1pmol/mgタンパク質であった。

[0118] 抑制効果は、化合物TM-2002と同様にして反応させた陽性対照(ピリドキサミン(シグマ))と比較することにより評価した。なお、アミノグアニジン、オルメサルタン、エダラボンについても、同様に抑制効果を調べた。結果(ペントシジン量nmol/ml)を、図1(図中、対照とあるのは、溶媒のみを使用した陰性対照を意味する。以下、同じ。)に示す。この結果から、TM-2002が陽性対照のピリドキサミンに比較して有意にペントシジンの生成を抑制することが理解される。

[0119] [試験例2]ヒドロキシラジカルによるフェニルアラニンのヒドロキシル化反応抑制効果

フェニルアラニン(最終濃度:1mM)、TM-2002(最終濃度:0. 1、0. 5、2. 5mM)、過酸化水素(最終濃度:5mM)、硫酸銅(最終濃度:0. 1mM)を200mMのリ

ン酸緩衝液(pH 7.4)に溶解し(全量500  $\mu$  L)、37°Cで4時間インキュベートした。インキュベート終了後、DTPA(最終濃度:1mM)、260 unitのカタラーゼを添加して反応を停止させた。o-チロシンおよびm-チロシンの生成量をHPLCで分析した。

[0120] すなわち、一定時間後、反応液を100倍希釈し20  $\mu$  LをHPLCにインジェクトし、C18カラム(4.6 $\times$ 250mm、5  $\mu$  m:野村化学製)で分離後、励起波長275nm、蛍光波長305nmの条件で蛍光検出器(RF-10A:島津製)を用いて検出した。移動相は、0.6mL/分の流速で、バッファB濃度を6.5%から10%まで25分間で変化させた(バッファA:0.10%トリフルオロ酢酸、バッファB:0.08%トリフルオロ酢酸を含む80%アセトニトリル)。結果を、アミノグアニジン、ピリドキサミンおよびオルメサルタンについて得られた結果とともに、図2および3に示す。

[0121] [試験例3]パーオキシナイトライトによるチロシンのニトロ化反応の抑制効果

試験は、Pannala ASらの方法(Free Radic Biol Med 24: 594-606, 1998)に準じて実施された。すなわち、チロシン(最終濃度:100  $\mu$  M)、TM-2002(最終濃度:0.1、0.5、2.5mM)、パーオキシナイトライト(同仁化学製)(最終濃度:500  $\mu$  M)を200mMのリン酸緩衝液(pH 7.4)に溶解し(液量500  $\mu$  L)、37°Cで15分間インキュベートさせた。インキュベート終了後、ニトロチロシンの生成量をHPLCで分析した。すなわち、一定時間後、反応液(20  $\mu$  L)をHPLCにインジェクトし、C18カラム(4.6 $\times$ 250mm、5  $\mu$  m:ウオーターズ製)で分離後、紫外検出器(RF-10A:島津製)を用い280nmの波長で検出した。移動相は、0.6mL/分の流速で、バッファB濃度を5.0%から30%まで30分間で変化させた(バッファA:0.10%トリフルオロ酢酸、バッファB:0.08%トリフルオロ酢酸を含む80%アセトニトリル)。4-ヒドロキシ-3-ニトロ安息香酸(100  $\mu$  M)を内部標準として使用した。結果を、アミノグアニジン、ピリドキサミン、オルメサルタンおよびエダラボンについて得られた結果とともに、図4に示す。

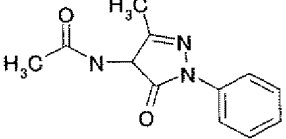
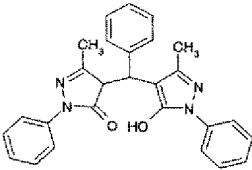
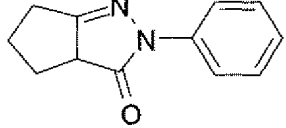
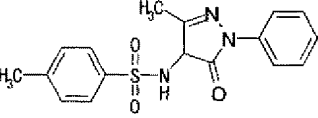
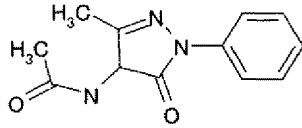
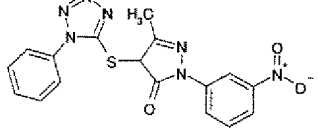
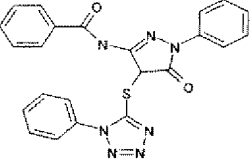
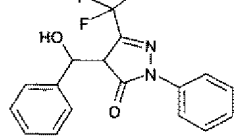
[0122] [試験例4]

患者血漿に代え、BSAとアラビノースとともにインキュベートする以外は、[試験例1]と同様にして、他の化合物(I)または(II)のペントシジン生成抑制活性を調べた。結果は、表1に示すとおりであった。なお、「-」は、試験を行わなかったことを示す。

[表1-1]

NO	化合物名 (Chemical name)	化学構造式	薬剤濃度 5 mM でのペントシジン 生成率 (%)
1	2-(3-アミノ-5-オキソ-1-フェニル-4,5-ヒドロ-1H-ピラゾール-4-イル)2-オキソ-N-フェニル-アセトアミド		-
2	2-(3-アミノ-5-オキソ-1-フェニル-4,5-ヒドロ-1H-ピラゾール-4-イル)2-オキソ-N-チアゾール-2-イル-アセトアミド		-
3	2-(3-アミノ-5-オキソ-1-フェニル-4,5-ヒドロ-1H-ピラゾール-4-イル)2-オキソ-アセトアミド		-
4	2-(3-アミノ-5-オキソ-1-フェニル-4,5-ヒドロ-1H-ピラゾール-4-イル)-N-(3,4-ジメチル-フェニル)-4-オキソ-ブチルアミド		-
5	2-(4-アミノ-フェニル)-4-(2-ヒドロキシ-エチル)-5-メチル-2,4-ヒドロ-ピラゾール-3-オン		-
6	5-アミノ-2-フェニル-4-(1-フェニル-1H-テトラゾール-5-イルスルファニル)-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン		-
7	3-(3-メチル-5-オキソ-1-フェニル-4,5-ジヒドロ-1H-ピラゾール-4-イル)-プロピオンニックアシッド		64.64

[表1-2]

NO	化合物名 (Chemical name)	化学構造式	薬剤濃度 5 mM でのペントシジ ン生成率 (%)
8	N-(3-メチル-5-オキソ-1-フェニル-4,5-ジヒドロ-1H-ピラゾール-4-イル)-アセトアミド		-
9	4-[(5-ヒドロキシ-3-メチル-1-フェニル-1H-ピラゾール-4-イル)-フェニル-メチル]-5-メチル-2-フェニル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン		7.52
10	2-フェニル-3a,4,5,6-テトラヒドロ-2H-シクロペンタピラゾール-3-オン		-
11	4-メチル-N-(3-メチル-5-オキソ-1-フェニル-4,5-ジヒドロ-1H-ピラゾール-4-イル)-ベンゼンスルホンアミド		-
12	N-(3-メチル-5-オキソ-1-フェニル-4,5-ジヒドロ-1H-ピラゾール-4-イル)-アセトアミド		54.21
13	5-メチル-2-(3-ニトロ-フェニル)-4-(1-フェニル-1H-テトラゾール-5-イルスルファニール)-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン		74.66
14	N-[5-オキソ-1-フェニル-4-(1-フェニル-1H-テトラゾール-5-イルスルファニール)-4,5-ジヒドロ-1H-ピラゾール-3-イル]-ベンズアミド		61.27
15	4-(ヒドロキシ-フェニル-メチル)-2-フェニル-5-トリフルオロメチル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン		-

[表1-3]

NO	化合物名 (Chemical name)	化学構造式	薬剤濃度 5 mM でのペントシジン 生成率 (%)
16	4-(1-ヒドロキシイミノ-エチル)-2,5-ジフェニル-2,4-ジヒドロ- ピラゾール-3-オン		-
17	5,5'-ジメチル-2,2'-ジフェニル- -2,4,2',4'-テトラヒドロ-[4,4']ビ ピラゾール-3,3'-ジオン		60.96
18	2-(4-クロロ-フェニル)-4-エチル -5-メチル-2,4-ジヒドロ-ピラゾ ール-3-オン		-
19	4-[4-(4-メトキシ-フェニル)-チア ゾール-2-イルスルファニール]-5- メチル-2-フェニル-2,4-ジヒドロ- ピラゾール-3-オン		40.19
20	4-(2-オキソ-2-フェニル-エチル)-2 フェニル-5-プロピル-2,4-ジヒドロ -ピラゾール-3-オン		83.12
21	5-メチル-2-フェニル-4-(4-p-トル イル-チアゾール-2-イルスルファニ ル)-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オ ン		42.07
22	2-(4-フルオロ-フェニル)-4-[[1-(4-フルオロ-フェニル)-5-ヒドロキシ-3-メチル-1H-ピ ラゾール-4-イル]-(2-ヒドロキシ- フェニル)-メチル]-5-メチル-2,4- ジヒドロ-ピラゾール-3-オン		2.9

[表1-4]

NO	化合物名 (Chemical name)	化学構造式	薬剤濃度 5 mM でのペントシジ ン生成率 (%)
23	N-(3,4-ジメチル-フェニル)-2-(3-メチル-5-オキソ-1-フェニル-4,5-ジヒドロ-1H-ピラゾール-4-イル)-2-オキソ-アセトアミド		-
24	5-(4-クロロ-ベンゾイル)-4,4-ジヒドロキシ-2-フェニル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン		-
25	ソジウム;4-ヒドロキシ-3-メチル-5-オキソ-1-フェニル-4,5-ジヒドロ-1H-ピラゾール-4-スルフォネイト		38.80
26	5-メチル-4,4-ジモルホリン-4-イル-2-フェニル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン		50.68
27	ソジウム;3-ベンゾイルアミノ-4-ヒドロキシ-5-オキソ-1-フェニル-4,5-ジヒドロ-1H-ピラゾール-4-スルフォネイト		2.83
28	3-メチル-1-フェニル-5-オキソ-4-スピロ(3-オキソ-2,3-ジヒドロ-ベンゾ[b]チオフェン-2-イル)-4,5-ジヒドロ-1H-ピラゾール		22.83
29	4,4,5-トリメチル-2-フェニル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン		-
30	4,10-ジメチル-2,8,11-トリフェニル-2,3,8,9-テトラザ-ジスピロ[4.0.4.1]ウンデカ-3,9-ジエン-1,7-ジオン		62.43

[表1-5]

NO	化合物名 (Chemical name)	化学構造式	薬剤濃度 5 mM でのペントシジ ン生成率 (%)
3 1	2-(2-クロロ-フェニル)-4-(3-エトキシ-4-ヒドロキシ-ベンジリデン)-5-メチル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン		15.57
3 2	2-(2-クロロ-フェニル)-4-(4-ジメチルアミノ-ベンジリデン)-5-メチル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン		8.7
3 3	5-メチル-4-(3-フェニル-アリリデン)-2-(3-トリフルオロメチル-フェニル)-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン		80.08
3 4	3-[5-[3-メチル-5-オキソ-1-(4-スルファモイル-フェニル)-1,5-ジヒドロ-ピラゾール-4-イリデンメチル]-フラン-2-イル]-ベンゾイックアシッド		-
3 5	4-(4-ジメチルアミノ-ベンジリデン)-2-(3-フルオロ-フェニル)-5-メチル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン		76.31
3 6	3-[4-[4-(3-クロロ-4,5-ジヒドロ-ピラゾール-1-イル)-ベンジリデン]-3-メチル-5-オキソ-4,5-ジヒドロ-ピラゾール-1-イル]-ベンゾイックアシッド		26.37
3 7	3-[4-(2-ヒドロキシ-ベンジリデン)-5-オキソ-3-フェニル-4,5-ジヒドロ-ピラゾール-1-イル]-ベンゾイックアシッド		0.02
3 8	3-[1-(3-クロロ-フェニル)-3-メチル-5-オキソ-1,5-ジヒドロ-ピラゾール-4-イリデンメチル]-1H-キノリン-2-オン		84.95

[表1-6]

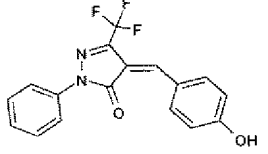
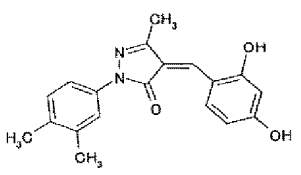
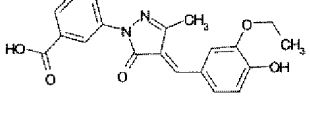
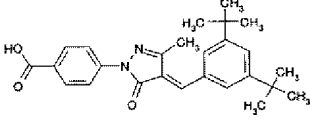
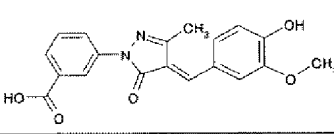
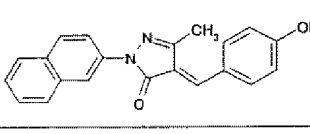
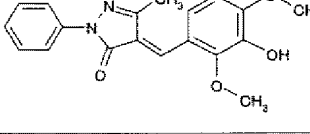
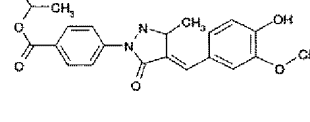
NO	化合物名 (Chemical name)	化学構造式	薬剤濃度 5 mM でのペントシジン 生成率 (%)
39	3-[5-[3-メチル-5-オキソ-1-(4-スルファモイル-フェニル)-1,5-ジヒドロ-ピラゾール-4-イリデンメチル]-フラン-2-イル]-ベンゾイックアシッドメチルエステル		16.87
40	4-(4-ベンゾ[1,3]ジオキソール-5-イルメチレン-3-メチル-5-オキソ-4,5-ジヒドロ-ピラゾール-1-イル)-ベンゾイックアシッドメチルエステル		32.37
41	4-[3-メチル-5-オキソ-4-[5-(4-スルファモイル-フェニル)-フラン-2-イルメチレン]-4,5-ジヒドロ-ピラゾール-1-イル]-ベンゾイックアシッドメチルエステル		37.81
42	2-(4-クロロ-フェニル)-4-(2,4-ジヒドロキシ-ベンジリデン)-5-メチル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン		68.32
43	2-(4-クロロ-フェニル)-4-(3-ヒドロキシ-ベンジリデン)-5-メチル-2,4-ジヒドロピラゾール-3-オン		3.00
44	4-(3,4-ジヒドロキシ-ベンジリデン)-5-メチル-2-p-トルイル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン		66.19
45	3-[1-(4-アセチル-フェニル)-3-メチル-5-オキソ-1,5-ジヒドロ-ピラゾール-4-イリデン]-1,3-ジヒドロインドール-2-オン		19.22

[表1-7]



NO	化合物名 (Chemical name)	化学構造式	薬剤濃度 5 mM でのペントシジ ン生成率 (%)
46	2-(4-フルオロ-フェニル)-4-(5-ヒドロキシ-3-メチル-1 <i>H</i> -ピラゾール-1-イルメチレン)-5-メチル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン		15.69
47	2-(4-クロロ-フェニル)-4-(4-ヒドロキシ-3-メトキシ-ベンジリデン)-5-トリフルオロメチル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン		28.86
48	2-(4-エチル-フェニル)-4-(4-ヒドロキシ-ベンジリデン)-5-メチル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン		0.02
49	4-[4-(4-ヒドロキシ-ベンジリデン)-3-メチル-5-オキソ-4,5-ジヒドロ-ピラゾール-1-イル]-ベンゼンスルホンアミド		7.09
50	4-(5-オキソ-4-チオフェン-2-イルメチレン-3-トリフルオロメチル-4,5-ジヒドロ-ピラゾール-1-イル)-ベンゾイックアシッド エチルエステル		63.17
51	4-[4-(4-ジメチルアミノ-ベンジリデン)-5-オキソ-3-トリフルオロメチル-4,5-ジヒドロ-ピラゾール-1-イル]-ベンゼンスルホンアミド		41.68
52	4-イソプロピリデン-5-メチル-2-フェニル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン		-

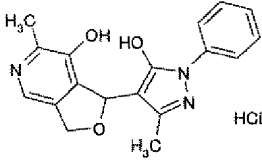
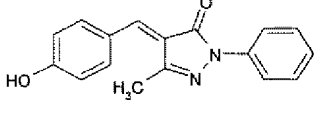
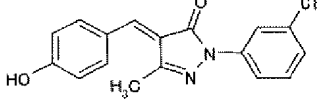
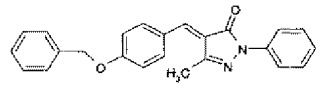
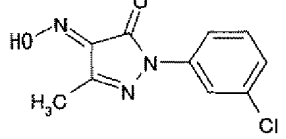
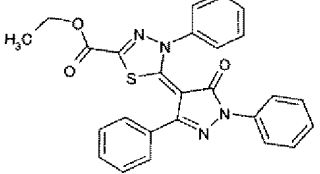
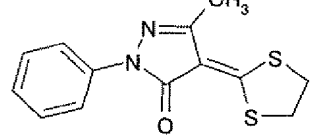
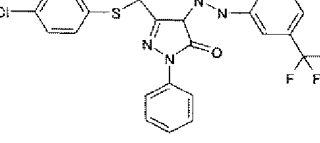
[表1-8]

NO	化合物名 (Chemical name)	化学構造式	薬剤濃度 5 mM でのペントシジン 生成率 (%)
53	4-(4-ヒドロキシ-ベンジリデン)-2-フェニル-5-トリフルオロメチル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン		66.76
54	4-(2,4-ジヒドロキシ-ベンジリデン)-2-(3,4-ジメチル-フェニル)-5-メチル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン		73.48
55	3-[4-(3-エトキシ-4-ヒドロキシ-ベンジリデン)-3-メチル-5-オキソ-4,5-ジヒドロ-ピラゾール-1-イル]-ベンゾイックアシッド		-
56	4-[4-(3,5-ジターシャリーブチル-4-ヒドロキシ-ベンジリデン)-3-メチル-5-オキソ-4,5-ジヒドロ-ピラゾール-1-イル]-ベンゾイックアシッド		-
57	3-[4-(4-ヒドロキシ-3-メトキシ-ベンジリデン)-3-メチル-5-オキソ-4,5-ジヒドロ-ピラゾール-1-イル]-ベンゾイックアシッド		-
58	3-[3-ヒドロキシ-4-(4-ヒドロキシ-3-メトキシ-ベンジリデン)-5-オキソ-ピラゾリジン-1-イル]ベンゾイックアシッド		0.07
59	4-(3-ヒドロキシ-2,4-ジメトキシ-ベンジリデン)-5-メチル-2-フェニル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン		5.3
60	4-[4-(4-ヒドロキシ-3-メトキシ-ベンジリデン)-3-メチル-5-オキソ-ピラゾリジン-1-イル]-ベンゾイックアシッド イソプロピル エステル		9.02

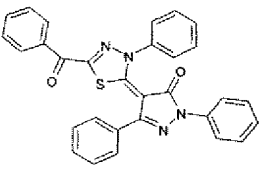
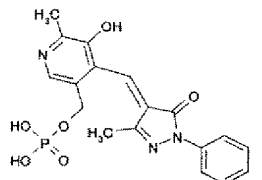
[表1-9]

NO	化合物名 (Chemical name)	化学構造式	薬剤濃度 5 mM でのペントシジン 生成率 (%)
6 1	2-クロロ-5-[4-(2-クロロ-4-ヒドロキシ-5-メトキシ-ベンジリデン)-3-メチル-5-オキソ-4,5-ジヒドロ-ピラゾール-1-イル]-ベンゾイックアシッド		46.25
6 2	4-[4-(4-ヒドロキシ-ベンジリデン)-3-メチル-5-オキソ-4,5-ジヒドロ-ピラゾール-1-イル]-ベンゾイックアシッド エチル エステル		-
6 3	4-[4-(4-ヒドロキシ-ベンジリデン)-5-オキソ-3-トリフルオロメチル-4,5-ジヒドロ-ピラゾール-1-イル]-ベンゾイックアシッド エチル エステル		-
6 4	4-[4-(4-ヒドロキシ-ベンジリデン)-3-メチル-5-オキソ-4,5-ジヒドロ-ピラゾール-1-イル]-ベンゾイックアシッド		-
6 5	4-ジメチルアミノメチレン-5-メチル-2-フェニル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン		62.43
6 6	4-(5-ヒドロキシ-3-メチル-1-フェニル-1H-ピラゾール-4-イルメチレン)-5-メチル-2-フェニル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン		15.17
6 7	4-(4-クロロ-ベンジリデン)-5-メチル-2-フェニル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン		9.09
6 8	1-(5-ヒドロキシ-3-メチル-1-フェニル-1H-ピラゾール-4-イル)-6-メチル-1,3-ジヒドロ-フロ[3,4-c]ピリジン-7-オール		2.82

[表1-10]

NO	化合物名 (Chemical name)	化学構造式	薬剤濃度 5 mM でのペントシジ ン生成率 (%)
69	1-(5-ヒドロキシ-3-メチル-1-フェニル-1H-ピラゾール-4-イル)-6-メチル-1,3-ジヒドロ-フロ[3,4-c]ピリジン-7-オール; ハイドロクロリック アシッド ソルト		2.94
70	4-(4-ヒドロキシ-ベンジリデン)-5-メチル-2-フェニル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン		0.04
71	2-(3-クロロ-フェニル)-4-(4-ヒドロキシ-ベンジリデン)-5-メチル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン		4.63
72	4-(4-ベンジルオキシ-ベンジリデン)-5-メチル-2-フェニル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン		7.63
73	2-(3-クロロ-フェニル)-5-メチル-2H-ピラゾール-3,4-ジオン 4-オキシム		66.42
74	5-(5-オキソ-1,3-ジフェニル-1,5-ジヒドロ-ピラゾール-4-イルイデン)-4-フェニル-4,5-ジヒドロ-[1,3,4]チアゾール-2-カーボキシリック アシッド エチル エステル		87.24
75	4-[1,3]ジチオラン-2-イリデン-5-メチル-2-フェニル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン		-
76	5-(4-クロロ-フェニルスルファニルメチル)-2-フェニル-4-[N'-(3-トリフルオロメチル-フェニル)-ヒドラジノ]-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン		-

[表1-11]

NO	化合物名 (Chemical name)	化学構造式	薬剤濃度 5 mM でのペントシジン 生成率 (%)
77	4-(5-ベンゾイル-3-フェニル-3H-[1,3,4]チアジアゾール-2-イリデン)-2,5-ジフェニル-2,4-ジヒドロ-ピラゾール-3-オン		—
78	フォスフォリックアシッド モノ-[5-ヒドロキシ-6-メチル-4-(3-メチル-5-オキソ-1-フェニル-1,5-ジヒドロ-ピラゾール-4-イリデンメチル)-ピリジン-3-イルメチル] エステル		—

[0123] [試験例5]バルーン傷害モデルによる検討

血管拡張術後再狭窄モデルであるラット頸動脈バルーン傷害モデルによる、血管内皮肥厚の抑制効果を検討した。

TM-2002をカルボキシメチルセルロースナトリウム(CMC)水溶液(0.5%)で乳鉢を用いて懸濁し、メスシリンダーで12.5mg/mLの濃度に調製した。

陽性対照としてアミノグアニジン塩酸塩(シグマ)を用い、同様にCMC水溶液(0.5%)で乳鉢を用いて懸濁し、メスシリンダーで11.25mg/mLの濃度に調製した。各調製液は用時調製してディスポーザブル注射筒および経口ゾンデを用いて懸濁させながら強制経口投与した。

[0124] 溶媒群(n=10)は、CMC水溶液(0.5%)を4mL/kg/回、1日2回経口投与した(8mL/kg/day)。TM-2002(被試物質)群(n=10)は、1-(5-ヒドロキシ-3-メチル-1-フェニル-1H-ピラゾール-4-イル)-6-メチル-1,3-ジヒドロ-フロ[3,4-c]ピリジン-7-オール塩酸塩を50mg/kg/回、1日2回経口投与した(100mg/kg/day)。アミノグアニジン群(n=10)は、アミノグアニジン塩酸塩を45mg/kg/回、1日2回経口投与した(90mg/kg/day)。

投与はバルーン傷害前日から開始し、傷害日を1日目として14日目までの合計15日間、1日朝夕2回6時間以上の間隔をあけて投与した(バルーン傷害15日目に解剖、15日目の投与は実施しない)。

- [0125] ラットは、9週齢(バルーン傷害時週齢:10週齢)のSD系雄性ラット(日本エスエルシー)を用いた。試験動物の入荷時に各動物の健康状態を肉眼的に観察し、異常のない動物を動物室に収容した。入荷時より6日間以上予備飼育した後、一般状態の良好な個体を試験に用いた。ラットを1群10匹とし、投与開始前の体重をもとに溶媒群、被試物質群、アミノグアニジン群の3群に分けた。
- [0126] ペントバルビタールナトリウム(40mg/kg, i. p.)麻酔下でラットの頸部および大腿部を切開し、左頸動脈および大腿動脈を露出する。大腿動脈に切開を加えバルーンカテーテル(2Fr, フォガティカテーテル;バクスター)を挿入し、先端を左頸動脈の内頸動脈分岐部まで導く。バルーンカテーテルが確実に頸動脈内にあることを目視で確認し、バルーン内に空気(0.3mL)を注入してバルーンを膨らます。バルーンを膨らませたまま大動脈弓までバルーンカテーテルを引き抜く。この操作を3回繰り返して血管内膜に傷害を与える。バルーンカテーテル抜去後、大腿動脈を結紮する。切開部を縫合し、傷口はイソジン液を用いて十分に消毒する。なお、右頸動脈には損傷を与えずに各個体の対照として用いる。
- [0127] 試験中は毎日動物の生死及び手術部位の状態について観察を行う。また体重は傷害前日からバルーン傷害14日目まで1日1回測定する。体重から各個体の投与容量を算出した。
- [0128] バルーン傷害15日目にエーテル麻酔下で腹部大静脈から採血を行う。採血後、左頸動脈を摘出して3分割し、各セクションから約5mmを切り取り、右頸動脈を摘出して中央部から約5mmを切り取りそれぞれ10%中性緩衝ホルマリンで固定した。ホルマリン固定した頸動脈標本はパラフィンブロックを作製後、薄切しHE染色を行った。画像解析装置(VM-30、オリンパス光学)で血管内腔面積、内弾性板で囲まれた面積および外弾性板で囲まれた面積を計測した。
- [0129] 測定した面積をもとに血管の新生内膜面積、中膜面積及び新生内膜/中膜面積比を各切片(3部位)について求めた。各個体で求めた3部位の平均値を用いて内膜肥厚を評価した。結果を図5(A、BおよびC)に示す。この結果から、TM-2002群は、陽性対照であるアミノグアニジン群に匹敵する血管内皮肥厚の抑制効果を示すことが理解される。

[0130] [試験例6]ビタミンB6との反応性の検討

ビタミンB6(ピリドキサル-5'-リン酸) ( $50 \mu\text{M}$ )とTM-2002 ( $0.5 \mu\text{M}$ )をリン酸塩緩衝食塩水(PBS)中、 $37^\circ\text{C}$ でインキュベートした。0-20時間の間でカイネティックスを測定するために、残存するピリドキサル-5'-リン酸濃度をHPLCで分析した。すなわち、一定時間後、 $10 \mu\text{L}$ の反応液をHPLCにインジェクトし、Purecil C18カラム( $4.6 \times 250\text{mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ :ウォータース製)で分離後、励起波長 $300\text{nm}$ 、蛍光波長 $400\text{nm}$ の条件で蛍光検出器(RF-10A:島津製)を用いて検出した。移動相は、 $0.6\text{ml/L}$ の流速で、バッファB濃度を0%から3%まで25分間で変化させた(バッファA:0.10%トリフルオロ酢酸、バッファB:0.08%トリフルオロ酢酸を含む80%アセトニトリル)。対照として、ビタミンB6捕捉作用が知られているアミノグアニジンを用いた。

[0131] 20時間後、TM-2002群のピリドキサル-5'-リン酸残存率は97%であったのに対し、対照のアミノグアニジン群のピリドキサル-5'-リン酸残存率はわずか0.2%であり、TM-2002がビタミンB6と反応しないことが示された。

なお、他の化合物(I)および(II)もTM-2002と同様の結果を示した。

[0132] [試験例7]ビタミンB6欠乏症抑制効果

正常ラット(WKYラット:日本エスエルシー)にTM-2002を投与し、ビタミンB6欠乏症の有無を検討した。対照として、ビタミンB6捕捉作用が知られているアミノグアニジンを用いた。動物数は、各群10匹とし、カルボキシメチルセルロース(0.5%)に懸濁したTM-2002またはアミノグアニジンをおのおの $13\text{mg/kg/匹/回}$ の量でゾルデにより1日2回強制経口投与した。投与期間は、20週とした。餌は、一般餌(CRF1:オリエンタル酵母)を用いた。

[0133] 20週後のWKYラットの形態を観察したところ、TM-2002投与群においては、口角炎、口内炎、舌炎、口唇炎、急性および慢性湿疹、接触性皮膚炎、末梢神経炎、貧血、リンパ球減少症、神経障害などのビタミン欠乏に起因する症状はまったく認められず、正常な状態を保っていた。一方、アミノグアニジン投与群では、皮膚炎、癩癰および脳障害による痙攣を認めた。

なお、他の化合物(I)および(II)もTM-2002と同様の結果を示した。

[0134] [試験例8]SHR／NDmcr-cpラットおよびWistar Kyotoラットにおける腎保護効果

従来より、高血圧、高血糖、高脂血症、肥満、高インスリン血症を呈することが知られ、週令の増加とともに腎機能に障害を来すことが知られているSHR／NDmcr-cp (SHR等疾患モデル共同研究会)ラットを用いて、腎保護効果を観察した。

9週令のSHR／NDmcr-cpラットおよびWistar Kyotoラット (SHR等疾患モデル共同研究会)を3週間馴化後、投薬前の体重測定・採血を行った。体重が440g±32gの範囲にあるものを群分けして1群5匹とした。群分け後、陰性対照としての賦形剤、陽性対照化合物および被検化合物を20週間投与した。賦形剤としてはカルボキシメチルセルロース(carboxymethyl cellulose Na/和光純薬工業株式会社製)溶液を、また、陽性対照化合物としては腎保護作用が知られているアンジオテンシンII受容体拮抗剤の1つであるオルメサルタンを用い、被検化合物であるTM-2002の効果を確認した。投与量としては、オルメサルタンは体重1kg当たり3mgとし、被検化合物のTM-2002は体重1kg当たり50mgに設定した。投与する検体については、オルメサルタンは、その必要量を1.0mlの0.5%カルボキシメチルセルロース溶液または蒸留水に懸濁・溶解して調製し、被検化合物のTM-2002についてはその必要量を1日に与える一定量(30g)の飼料に混合して調製した。試験動物は体重増加が大きく、毎週行う体重測定に基づいて陽性対照化合物および被検化合物の量を調整した。投与方法としては陰性対照投与群においては賦形剤の0.5%カルボキシメチルセルロース溶液を、また、陽性対照化合物投与群においては必要量を調整したオルメサルタンの0.5%カルボキシメチルセルロース溶液をそれぞれ1mlずつゾンデで経口投与し、被検化合物群においてはTM-2002の必要量を調整した飼料の1日の設定投与量を自由に摂取させた。飼料の摂取量は陰性対照としての賦形剤投与群、陽性対照化合物群、被検化合物群とも1日当たり30gとして全量を摂取させた。投与期間中、体重については毎週測定したが、採血、採尿、および血圧測定の各測定項目については、4週令までは隔週毎に行い、5週令以降は4週毎に行った。採血は動物を38℃の保温器で温めた後、尾静脈より800μl採血を行った(ヘパリン処理:ヘパリン量は血液1mlに対して15μlの割合とする)。採尿は採尿代謝ケージ(日



本クレア社製)により行った。採尿時には1日尿量を測定した。血圧測定は非観式血圧測定装置(株式会社ソフトロン社製)を用いて行った。

各採血、採尿サンプルを用い、血液サンプルでは血中グルコース、トリグリセライド、総コレステロール、ヘモグロビンA1c、インシュリンの濃度を測定した。また、尿サンプルを用い、尿中の蛋白、クレアチニン、尿素窒素量を測定した。これらの検査は日本SRL株式会社に依頼して行った。

- [0135] 該試験での33週令における腎保護効果に関する結果は、陰性対照の賦形剤投与群は高血圧を呈し、尿蛋白も高値を示し、その値から腎機能障害を起こしていることが示されていた。これに対して陽性対照化合物のオルメサルタンは降圧剤であるため血圧低下が見られ、尿蛋白が抑制され、腎機能の改善が見られた。一方、被検化合物は陰性対照に比較し、血圧低下が見られないにもかかわらず有意に尿蛋白を抑制し、陽性対照のそれよりも抑制効果は強く、優れた腎保護効果を示した。この結果は、高血圧症を伴わない腎疾患における治療や、腎保護作用を有さない降圧剤との併用による腎疾患治療、さらには、腎保護効果を有する降圧剤との併用による相乗効果が期待でき、腎疾患治療薬として有用である。該結果を図7および図8に示す。

- [0136] [試験例9]Thy-1腎炎モデルラットに対する腎保護作用

本病態モデルはメサングウム増殖性腎炎を呈する代表的な糸球体腎炎モデルであり、Wistarラット(雄、体重150g、6週齢)に抗Thy-1抗体であるOX-7を1.2mg/kg尾静脈投与することによって作製する。抗Thy-1抗体を投与した後、被検化合物(TM-2002、50mg/kg体重、1日2回)を0.5%カルボキシメチルセルロースに懸濁させゾンデにより5日間連続強制投与、6日目に採材し、腎臓を採取、病理解析(糸球体細胞数のカウント)を行った。具体的には、常法に従いPAS染色した染色像を3CCDカメラ(オリンパス)で取り込んだ後、イメージグラファPCI(富士写真フィルム)とマックアスペクト(三谷株式会社)のソフトウェアを使用して糸球体細胞数を解析した。また、血液・尿の生化学的解析(臨床解析受託会社:SRL)も行った。その結果、TM-2002投与群では蛋白尿の値が改善され、BUN値においてはその値が有意( $p < 0.01$ )に改善されているとともに、障害に伴い増殖する糸球体細胞数も有意差

をもって大幅に抑制 ( $p < 0.0001$ ) され、その腎保護作用が示された。その結果を図8ー図10に示す。

[0137] [試験例10] 虚血再灌流モデルラットに対する腎保護作用

本病態モデルは、代表的な急性腎不全モデルである。作製方法として、Wistarラット(雄、体重150g、6週齢)の右腎摘出手術を行い、翌日全身麻酔下に残った左片腎の腎動脈をクリップで結紮する。クリップ後体温が下がらないように加温器の上で45分間観察(虚血)した後、クリップをはずし再灌流を行う。虚血再灌流モデル作製後、被検化合物(TM-2002、50mg/kg体重、1日2回)を0.5%カルボキシメチルセルロースに懸濁させゾンデにより2日間連続強制投与し、3日目に腎臓を採取し、病理解析(尿細管間質障害のスコアリング)を行った。具体的には、常法に従いPAS染色した腎染色像の尿細管間質障害は尿細管壊死、尿細管肥大、尿細管萎縮、尿細管基底膜肥厚、castの有無を評価した。併せて血液の生化学的解析(臨床解析受託会社:SRL)も行った。その結果、TM-2002投与群では蛋白尿の値およびBUN値が改善され、また、障害に伴い増殖する糸球体細胞数は有意差をもって大幅に抑制 ( $p < 0.0001$ ) され、その腎保護作用が示された。その結果を(図11ー図13)に示す。

[0138] [試験例11]

中大脳動脈虚血再灌流モデルにおける脳保護作用

体重270ー350gのCD(SD)IGS雄性ラット(日本チャルスリバー株式会社 日野生産場22号室特定生産)(1群8匹)を2%イソフルラン(70% $N_2O$ (笑気ガス)と30% $O_2$ の混合ガス)で麻酔して不動化した後に、ヒーティングパット上に置き、動物の直腸温と脳温を37ー38℃に保持した。次いで、実験上の安定性を観察するために、該動物の尾動脈にポリエチレン製カニューレ(PE-50/ベクトン・ディッキンソン社製)を挿入、留置し、これより採血や血圧測定を行い血糖値、ヘマトクリット、 $CO_2$ 濃度、酸素分圧、pH、血圧等の生化学的パラメーターをモニターした。また、皮質における脳血流量はレイザー・ドップラー・フルオメトリー(neuroscience. inc社製/製品名: OMEGA FLOW(FLO-C1))検出部位をブレグマ左4mmの位置に、直接頭蓋にあてて測定した。このように準備された動物左頸部を切開し、総頸動脈の内頸・外

頚動脈分岐点から内頚動脈の上流に向け、長さ16mm、直径0.2～0.3mmで先端3mmをシリコンコーティングしたナイロン製外科用スレッドを通したまま留置し、2時間のあいだ中大脳動脈を閉塞した。その後スレッドを抜き取り中大脳動脈を開放し21時間のあいだ血液を再還流した。対照であるエダラボン(3.0mg/kg)および被験薬物であるTM-2002(5.58mg/kg)を、は中大脳動脈を閉塞後5分後と5時間後に尾動脈に留置したカニューレより2回投与した。上記手技が終了後、動物より脳を摘出し、2mm厚で7枚の脳切片を調製後、生理食塩水40mlに2,3,5-triphenyltetrazolium chloride(シグマ社製)を0.8g溶解した液(TTC染色液)に37℃で15分間浸漬して染色処理を施した後に10%の中性ホルマリン液を用いて固定し、標本とした。これらの標本は、それぞれCCDカメラで画像化し、Swanson等の方法(J Cereb Blood Flow Metab 10:290-293; 1994)によって解析した。その結果、対照薬剤のエダラボンおよび被検薬剤のTM-2002は、それぞれ、賦形剤単回投与群と比較して有意差をもって脳梗塞巣を縮小した。結果を図14および図15に示す。また、神経状態の評価は施術マウスを水平な台の上におき、横から押して麻痺なく正常に歩ける状態のものをグレード0、横から押して抵抗があり、前にまっすぐ歩けるが、前脚の屈曲を呈するような状態をグレード1、横から押して抵抗がないが、前にまっすぐ歩ける状態のものをグレード2、横から押すと抵抗がなく前にまっすぐ歩けない(回転や転倒する)状態のものをグレード3に分類し、四段階の基準による、Bedersonらの方法によるグレーディングシステム(Stroke 17:472-476, 1990)で評価した。更に、機能回復の面では、回転ローター上にマウスを歩かせ、その歩行状態がどの程度可能であるかを評価する方法による、ローターロード試験を施術前後に行いその評価を行った。その結果、対照薬剤のエダラボンおよび被検薬剤のTM-2002において、それぞれ、賦形剤単回投与群と比較して有意差をもって神経状態の改善および機能回復が認められた。その結果を表2に示す。

[0139] [表2]

表 2

試験名	賦形剤単回投与		エタラボン		TM-2002	
	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差	平均値	標準偏差
神経状態評価試験*						
閉塞後 10分後	2.9	0.3	2.8	0.4	2.8	0.7
閉塞後 2時間後	2.9	0.3	2.7	0.5	2.6	1.1
再還流後 10分後	2.4	1.1	2.2	1.0	1.5	1.6
再還流後 3時間後	2.3	1.1	2.1	1.0	1.3	1.5
再還流後 4時間後	2.3	1.1	2.0	1.2	2.0	1.4
再還流後 22時間後	1.6	1.4	1.5	1.2	2.0	1.4
ローターロッド試験**						
閉塞前	202.7	123.0	197.0	123.4	183.4	138.0
再還流	67.1	70.5	153.1	132.5	160.6	128.6
閉塞前に対する比率(%)	81.4	131.8	160.4	190.0	78.1	30.6

\*：神経状態評価試験の数値はBedersonらのグレーディングシステムにより算出。

\*\*：ローターロッド試験の数値はローターロッドマシンのカウント数読み取り値。

#### [0140] [試験例12]溶解性の検討試験

TM-2002を1ml中10mgになるように精製水の中に加え、塩酸を加えてpH2.0に調整して溶解した。次いで、この溶液のpHを1N水酸化ナトリウム溶液でpH7.0、pH8.0およびpH2.0(無調整)に調整し、3溶液を製造した。この溶液を室温冷暗所に置き24時間後に溶液の状態を観察した。その結果、pH2.0においては澄明な溶液状態を維持していたが、pH7.0、pH8.0では沈殿物の析出が見られた。特にpH7.0、pH8.0では色調の変化も見られた。この結果より、TM-2002の注射製剤には塩酸、硫酸などの無機酸の他、各種の有機酸を用いて酸性状態を維持するか、該各種酸を用いて作成したTM-2002塩酸塩、硫酸塩を原料に用いることにより溶解性において安定な製剤を作れることが示唆された。

#### [0141] [試験例13]安定化剤の検討

通常、疾患治療用薬剤の安定化には各種の安定化剤が用いられ、有効な方法としては抗酸化剤の添加がよく知られている。特に酸化を受けやすい化合物の安定化には酸化還元電位の低い物質を共存させることがよいとされている。そこで、通常注射製剤等に用いられる亜硫酸水素ナトリウム( $\text{NaHSO}_3$ )とL-システイン( $\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_2\text{S}\cdot\text{HCl}$ )について、TM-2002塩酸塩の水溶液を用いて添加実験を行い、その安定性を検討した。

[0142] はじめに亜硫酸水素ナトリウムの添加によるTM-2002塩酸塩の溶解状態を検討した。実験方法は、精製水と亜硫酸水素ナトリウム0.5mgおよび1mgを溶解した水溶液を各1mlずつ用意した。次いで、これらにTM-2002塩酸塩を63mgずつ加え、よく攪拌して溶解した。これらの溶液を室温で放置し、その溶解状態を観察した。その結果、亜硫酸水素ナトリウムの0.5mgおよび1mgを加えた溶液では時間とともに結晶性の沈殿物が析出し、24時間後には明らかな沈殿物の存在が観測された。これに対して精製水のみに溶かした溶液ではpHが2〜2.5を呈し、24時間後でも溶解状態に変化は見られず、また、TM-2002の分解の大幅な抑制も観察された。すなわち、塩酸塩を用いることでTM-2002自体の安定化は増大する。

[0143] 上記実験の亜硫酸水素ナトリウムに代えて、亜硫酸ナトリウム( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ )、ピロ亜硫酸ナトリウム( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ )を用いて同様の実験を行ったが、これらの安定化剤を添加した溶液では全てに結晶性の沈殿物の析出が観察された。

次いで、L-システイン塩酸塩の添加によるTM-2002塩酸塩の溶解状態を検討した。実験方法は、L-システイン塩酸塩1mgおよび2mgを精製水に溶解した水溶液を各1mlずつ用意した。L-システイン塩酸塩を加えた溶液においてはpHを6.5に調整した。次いで、それぞれの溶液にTM-2002塩酸塩を63mgずつ加え、よく攪拌して溶解した。これらの溶液を室温で放置し、その溶解状態を観察した。その結果、いずれの溶液にも沈殿物、析出物は見られず、24時間後でも安定な溶解状態を保った。また、分解性においては薄層クロマトグラフィー(TLC/ Silica-gel 60F 254(メルクジャパン株式会社)/展開溶媒:クロロホルム:メタノール=9:1/検出:UV=254nm)での観察により、24時間以上の室温放置で徐々に分解するが、L-システインの添加により大幅に安定化された。さらに、本溶液を $-20^{\circ}\text{C}$ に保存すると1週間後でも安定であった。すなわち、本発明により、L-システインを含有するTM-2002塩酸塩の溶液を低温で処理し、凍結乾燥することで、TM-2002の凍結乾燥製剤が得られる。

[0144] TM-2002注射用凍結乾燥製剤の調製

L-システイン塩酸塩160mgを精製水80mlに加えた後、よく攪拌して溶解した。次いで、この溶液のpHを1N水酸化ナトリウム溶液でpH6.7に調整した後、TM-200

2の塩酸塩を1g加えよく攪拌して溶解した後、メスフラスコで100mlに定溶した。該調製液は6.3mlずつを50ml容積のバイアル瓶に6.3mlずつ分注し、直ちにドライアイスで凍結させた後 $-80^{\circ}\text{C}$ に放置して完全に凍結させた。次いで、これを凍結乾燥機に3日間かけて凍結乾燥を行った。凍結乾燥終了後、ゴム蓋をした後、アルミキャップで締機を用いて密封し、TM-2002注射用凍結乾燥製剤を得た。

[0145] TM-2002注射用凍結乾燥製剤の溶解性と安定性

上記調製法により作成したTM-2002注射用凍結乾燥製剤に、1バイアル当たり20mlの精製水を加えた。凍結乾燥物は直ちに溶解し、淡黄色の澄明な溶液となった。この溶液1mlに生理食塩水1.5mlを加え、室温に放置した状態で、溶解状態並びに安定性を、溶解の3時間後、6時間後および10時間後に観察した。成分の変化の有無はTLC (Kiesel gel 60F254/展開溶媒: $\text{CHCl}_3$ :MeOH=9:1/検出:UV=254nm)を用いて行った。その結果、本溶液は、溶解の10時間後においても沈殿物や結晶、不溶物の析出などはまったく見られず、また、目立った色調の変化も見られなかった。さらに成分の安定性においては、対照としたTM-2002塩酸塩の水溶液は10時間目に分解物が観察されるのに対して、本注射用製剤の溶液では分解物は観察されなかった。その薄層クロマトグラフィーによる結果を図16に示す。また、生理食塩水での希釈率を高めても同様に安定であることも明らかとなった。さらに、該注射用凍結乾燥製剤は30日間室温に放置したものを同様の溶解法により溶解性、安定性を観察したが、製作直後のものと差異は見られず、用時調製用の注射用凍結乾燥製剤として十分な性能を発揮し、安定かつ実用的である。

[0146] [試験例14] TM-2002のin vivoにおける小胞体ストレス(ER stress)軽減作用の評価

従来より、高血圧、高血糖、高脂血症、肥満、高インスリン血症を呈することが知られ、週令の増加とともに腎機能に障害を来すことが知られているSHR/NDmcr-cp (SHR等疾患モデル共同研究会)ラットの腎組織を用いて、抗ORP150抗体で免疫染色を行いTM-2002の小胞体ストレスの軽減作用を評価した。染色に用いた染色切片サンプルは、SHR/NDmcr-cpラットに、被検化合物TM-2002の投与量を体重1kg当たり100mgに設定して、その必要量を1日に与える一定量(30g)の飼

料に混合してその全量を摂取させた群と薬剤を投与しない群、また、比較対照に置いたSHR(高血圧)ラットおよびWistar Kyotoラットのそれぞれの腎組織を薬剤投与期間終了後(33週齢)に採材して、全てをカルノア固定した後にパラフィン包埋したものをを用いて切片標本を作成した。各サンプルの切片の染色は、DAKO社のCatalyzed Sifnal Amplification(CSA) Systemを使用するので、そのプロトコルに準じて行った。まず、脱パラフィンをHisto-Clear(pational diagnostics社)で5分間3回、100%エタノールで3分間3回ずつ行い、蒸留水に5分間馴染ませた。その後、10mMクエン酸ナトリウム水溶液(pH. 6. 0)の中に入れ、マイクロウェーブで5分間沸騰させて加熱処理を施し、抗原を賦活化した。このサンプルを室温で冷やし、TBS-T(0. 05M Tris-HCl pH7. 6, 0. 3M NaCl, 0. 1% Tween 20)にて4分間3回洗浄した。その後、3%過酸化水素水(DACO社)に3分間漬け、内因性ペルオキシダーゼをブロックした。次いで、PROTEIN BLOCK(DACO社)にて5分間、抗体の非特異的反応の阻止を行い、1. 5%ヤギ血清で400倍に希釈した抗ORP150抗体を一次抗体として15分間反応させた後に、TBS-Tにて4分間3回洗浄した。その後、200倍に希釈したビオチン標識ヤギ抗ウサギ抗体を2次抗体として15分間反応させ、TBS-Tにて4分間3回洗浄した。このようにして処理したサンプルに、Streptavidin-Biotin Complex(DACO社)を15分間反応後、TBS-Tにて4分間3回洗浄した。次いで、Amplification Reagent(DACO社)で15分間反応後、TBS-Tにて4分間3回洗浄した後に、Streptavidin-peroxidase(DACO社)と15分間反応させた後、TBS-Tにて4分間3回洗浄した。そして、Substrate-Chromogen Solutionにて、DAB発色を行い、蒸留水にて水洗し、脱水を100%エタノールで3分間3回、Histo-Clear(pational diagnostics)で5分間3回行い、封入して標本を完成した。該標本は光学顕微鏡(オリンパス社製)により検鏡し、結果の解析を行った。その結果、コントロールであるWistar Kyotoラット、高血圧モデルであるSHRラットでのORP150陽性染色部位が無く、2型糖尿病高血圧モデルであるSHR/NDmcr-cpラットに陽性染色部位を認め、SHR/NDmcr-cpラットにおいて小胞体ストレスの亢進を認めた。さらに、SHR/NDmcr-cpのTM-2002投与群では、陽性染色部位の減少を認め、小胞体ストレスが抑制されていた(図17参照)。

[0147] [試験例15] TM-2002の小胞体ストレス誘導性分子の発現変動における薬効評価

6穴培養皿にラット膵臓β細胞株(RIN-5F)を $1.0 \times 10^5$  cells/wellになるよう播種し、24時間後、DMSOに200mM、50mMの濃度で溶解したTM-2002を最終濃度200  $\mu$  M、50  $\mu$  Mになるよう添加した。さらに1時間後、メタノールで1mg/mlに溶解したツニカマイシン(Sigma社)を0.2  $\mu$  l添加した。8時間培養後、細胞を2mlのPBS(+)で2回洗浄後、溶解液(50mM Tris-HCl(pH7.5)、150mM NaCl、100mM NaF、100mMリン酸ナトリウム(pH7.4)、2mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ 、0.1% protease inhibitor cocktail(Sigma社)、1% Triton X-100)100  $\mu$  lで細胞を溶解した。この細胞溶解液の不溶化画分を除くため12,000  $\times$  gで10分間遠心分離し、上清を回収し、細胞抽出液とした。得られた細胞抽出液をDC protein assay kit(Bio Rad社)を使用し、蛋白濃度の定量を行った後、各検体1  $\mu$  gをSDS-PAGEで電気泳動し、PVDFメンブレンに転写した。その後、5%スキムミルク/0.1% Tween20-TBSで1時間、室温でブロッキングを行い、特異抗体として抗ORP150抗体を5%スキムミルク/0.1% Tween20-TBSで2000倍希釈、抗GRP78抗体(Santa Cruz社)を5%スキムミルク/0.1% Tween20-TBSで100倍希釈、抗アクチン抗体(Sigma社)5%スキムミルク/0.1% Tween20-TBSで200倍希釈し、それぞれ室温で2時間反応させた。0.1% Tween20-TBSで10分、3回洗浄後、ORP150、アクチンの検出には二次抗体としてHRPラベルされた抗ウサギ抗体(Bio-Rad社)を5%スキムミルク/0.1% Tween20-TBSで2,000倍希釈し、GRP78の検出には二次抗体としてアルカリフォスファターゼ標識された抗ヤギ抗体を5%スキムミルク/0.1% Tween20-TBSで5000倍希釈し使用し、室温で1時間反応させた。0.1% Tween20-TBSで10分、3回洗浄後、ECL western blotting detection reagent(Amersham Bioscience社)を使用し検出を行った。検出後のシグナルをLane analyzer(ATTO社)により解析し、シグナル強度の算出を行った。その結果、ツニカマイシン添加検体ではコントロール検体に対し、1.88倍のORP150の発現亢進、1.46倍のGRP78の発現亢進を認め、小胞体ストレスが惹起されていることが分かる。TM-2002およびツニカマイシンの共添加検体では、ツニカマイシンによるORP150、GRP78の発現亢進は抑制され、ツニカマイシンにより惹



起された小胞体ストレスが軽減されていることが分かる(図18および図19参照)。

#### 図面の簡単な説明

[0148] [図1]ペントシジン生成に対するTM-2002の抑制効果を示す図。

[図2]ヒドロキシラジカルによるフェニルアラニンのヒドロキシル化反応に対するTM-2002の抑制効果(o-チロシン生成抑制を指標とする)を示す図。

[図3]ヒドロキシラジカルによるフェニルアラニンのヒドロキシル化反応に対するTM-2002の抑制効果(m-チロシン生成抑制を指標とする)を示す図。

[図4]パーオキシナイトライトによるチロシンのニトロ化反応に対するTM-2002の抑制効果を示す図。

[図5]ラット頸動脈バルーン傷害モデル実験におけるTM-2002の血管内皮肥厚抑制効果を示す写真(Aは対照;BはTM-2002 50mg/kg投与;Cはアミノグアニジン 45mg/kg投与)。

[図6]TM-2002が血圧降下作用を有していないことを示す図。

[図7]TM-2002が尿蛋白抑制作用を有することを示す図。

[図8]TM-2002がThy-1腎炎モデルにおいてBUN値を減少させることを示す図。

[図9]TM-2002がThy-1腎炎モデルにおいて尿蛋白値を減少させることを示す図。

。

[図10]TM-2002がThy-1腎炎モデルにおいて糸球体細胞数を減少させることを示す図。

[図11]TM-2002が虚血再灌流モデルにおいてBUN値を減少させることを示す図。

。

[図12]TM-2002が虚血再灌流モデルにおいて尿蛋白値を減少させることを示す図。

。

[図13]TM-2002が虚血再灌流モデルにおいて間質障害スコアを減少させることを示す図。

[図14]TM-2002が脳梗塞巣を縮小させることを示す図。

[図15]TM-2002が脳梗塞巣を縮小させることを示す図。

[図16]TM-2002注射用凍結乾燥製剤の水溶液の安定性を示す図。

[図17]TM-2002がSHR／NDmcr-cpの陽性染色部位を減少させることを示す図

。

[図18]TM-2002がツニカマイシンによりOPR150の発現亢進を抑制することを示す図。

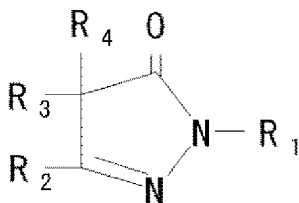
[図19]TM-2002がツニカマイシンによりGRP78の発現亢進を抑制することを示す図。

## 請求の範囲

- [1] 遊離形または塩形の1-置換または非置換-3-置換または非置換-2-ピラズリン-5-オンの4位に、ビタミンB6分子の結合を妨げる置換基(ビタミンB6分子自体に由来するものを含む)を導入した化合物またはその転位体を有効成分とする、蛋白修飾物生成抑制剤。

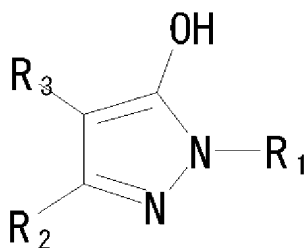
- [2] 有効成分である化合物が、遊離形または塩形の式(I)：

[化1]



または式(II)：

[化2]



[式中、R1は置換または非置換の芳香環基であり、R2、R3およびR4はそれぞれ水素原子または1価の有機基であるか、またはR2とR3は両者合して縮合環を形成するか、もしくはR3とR4は両者合して2価の有機基を表す。ただし、R3とR4が共に水素原子であることはない。]

で示される化合物から選択される、請求項1記載の蛋白修飾物生成抑制剤。

- [3] R1で表される芳香環基が、4個を越えることのないヘテロ原子を含むことがある、20個を越えることのない環構成原子を有する炭素環または異項環の芳香環基であって、3つを越えない置換基を有することがあるものである、請求項2記載の蛋白質修飾物生成抑制剤。
- [4] R2、R3またはR4で表される1価の有機基が、それぞれ独立して、炭素数30個を越

えない、鎖状または環状の脂肪族、脂環式または芳香族炭化水素基であって、3つを越えない置換基を有することのあるものであるか、またはハロゲン基、ニトロ基、アミノ基、ヒドロキシ基、チオール基、カルボキシ基、カルボキシ(低級)アルキル基、低級アルコキシカルボニル基、ホルミル基、低級アルカノイル基、低級アルキルアミノ基、ジ(低級)アルキルアミノ基、低級アルカノイルアミノ基、アリール(低級)アルカノイル基、アリールオキシアミノ基、スルホン酸基または3〜7員ヘテロ環基であって、置換基を有することのあるものである、請求項2または3記載の蛋白修飾物生成抑制剤。

[5] R2とR3が両者合して形成する縮合環が、5〜6員炭素飽和環であって、置換基を有することもあるものである、請求項2または3記載の蛋白修飾物生成抑制剤。

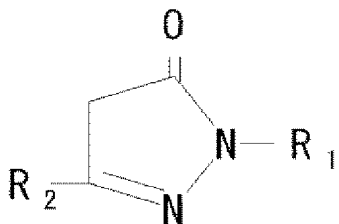
[6] R3とR4が両者合して形成する2価の有機基が、フェニルメチレン、フェニルアルケニルメチレン、キノリルメチレン、フラニルメチレン、ジアゾリルメチレン、アミノメチレン、ジ(低級)アルキルアミノメチレン、ピリジルメチレンおよびチオフェニルメチレンから選択されたものであって、置換基を有することもあるものである、請求項2または3記載の蛋白修飾物生成抑制剤。

[7] 置換基が、低級アルキル基、低級アルケニル基、低級アルコキシ基、低級アルケニルオキシ基、低級アルカノイル基、ハロ(低級)アルキル基、カルボキシル基、低級アルコキシカルボニル基、カルボキシ(低級)アルキル基、ハロゲン基、ニトロ基、アミノ基、低級アルキルアミノ基、ジ(低級)アルキルアミノ基、低級アルカノイルアミノ基、ヒドロキシ基、チオール基、ヒドロキシスルホニル基、アミノスルホニル基、アリール(低級)アルカノイル基、アリールオキシアミノ基、アリール基、アリール(低級)アルキル基、シクロ(低級)アルキル基、シクロ(低級)アルケニル基、シクロ(低級)アルキル(低級)アルキル基および3〜7員ヘテロ環基から選択されたものである、請求項3〜6のいずれか記載の蛋白修飾物生成抑制剤。

[8] 式(I)において、R1がフェニル基、R2がメチル基、R3とR4が合して3-ヒドロキシ-5-ヒドロキシメチル-2-メチルピリジン-4-イルメチレン基である、請求項2記載の蛋白修飾物生成抑制剤。

[9] 式(II)において、R1がフェニル基、R2がメチル基、R3が6-メチル-1, 3-ジヒドロフロ[3, 4-c]ピリジン-7-オール基である、請求項2記載の蛋白修飾物生成抑制剤。

- [10] 蛋白修飾物が、AGEs、ALEsおよびこれらの組合せよりなる群から選択されるものである、請求項1〜9のいずれか記載の蛋白修飾物生成抑制剤。
- [11] 蛋白修飾物がAGEsである、請求項10記載の蛋白修飾物生成抑制剤。
- [12] AGEsがペントシジンである、請求項11記載の蛋白修飾物生成抑制剤。
- [13] 請求項1〜12のいずれか記載の蛋白修飾物生成抑制剤を含む、腎組織保護剤。
- [14] 請求項1〜12のいずれか記載の蛋白修飾物生成抑制剤を含む、腹膜透析液。
- [15] 請求項1〜12のいずれか記載の蛋白修飾物生成抑制剤を含む、血液透析液。
- [16] 請求項1〜12のいずれか記載の蛋白修飾物生成抑制剤を液体試料と接触させる工程を含む、液体試料のカルボニル化合物含有量を低減させる方法。
- [17] 請求項1〜12のいずれか記載の蛋白修飾物生成抑制剤を患者の血液または腹膜透析液と接触させる工程を含む、蛋白修飾物の生成抑制方法。
- [18] 蛋白修飾物生成抑制剤として有用な、遊離形または塩形の1-置換または非置換-3-置換または非置換-2-ピラゾリン-5-オンの4位に、ビタミンB6分子の結合を妨げる置換基(ビタミンB6分子自体に由来するものを含む)を導入することを特徴とする、当該蛋白修飾物生成抑制剤に起因するビタミンB6欠乏症を抑制する方法。
- [19] 1-置換または非置換-3-置換または非置換-2-ピラゾリン-5-オンが、式(III)：  
[化3]



[式中、R1は水素原子または置換または非置換の芳香環基であり、R2は水素原子または1価の有機基である。]

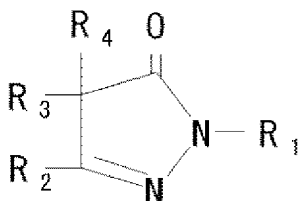
で表される化合物から選択されるものである、請求項18記載の方法。

- [20] 4位に導入される、ビタミンB6分子の結合を妨げる置換基が有機基から選択されるものである、請求項18または19記載の方法。
- [21] 遊離形または塩形の1-置換または非置換-3-置換または非置換-2-ピラゾリン-5-オンの4位に、ビタミンB6分子の結合を妨げる置換基(ビタミンB6分子自体に由来

するものを含む)を導入した化合物またはその分子内転位体。

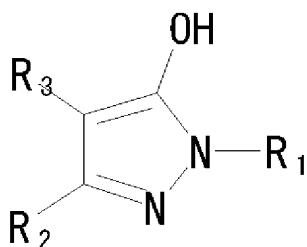
[22] 遊離形または塩形の式(I)：

[化4]



または式(II)：

[化5]



[式中、R1は置換または非置換の芳香環基であり、R2、R3およびR4はそれぞれ水素原子または1価の有機基であるか、またはR2とR3は両者合して縮合環を形成するか、もしくはR3とR4は両者合して2価の有機基を表す。ただし、R3とR4が共に水素原子であることはない。]

で示される化合物。

[23] 式(I)において、R1がフェニル基、R2がメチル基、R3とR4が合して3-ヒドロキシ-5-ヒドロキシメチル-2-メチルピリジン-4-イルメチレン基である、請求項22記載の化合物。

[24] 式(II)において、R1がフェニル基、R2がメチル基、R3が6-メチル-1, 3-ジヒドロフロ[3, 4-c]ピリジン-7-オール基である、請求項22記載の化合物。

[25] 蛋白修飾物生成抑制剤の製造における請求項21～24のいずれか記載の化合物の使用。

[26] 蛋白修飾物生成により仲介される疾患の処置方法であって、当該処置を必要としている対象に、治療上有効量の請求項21～24のいずれか記載の化合物を投与する

ことを含んでなる方法。





図 2

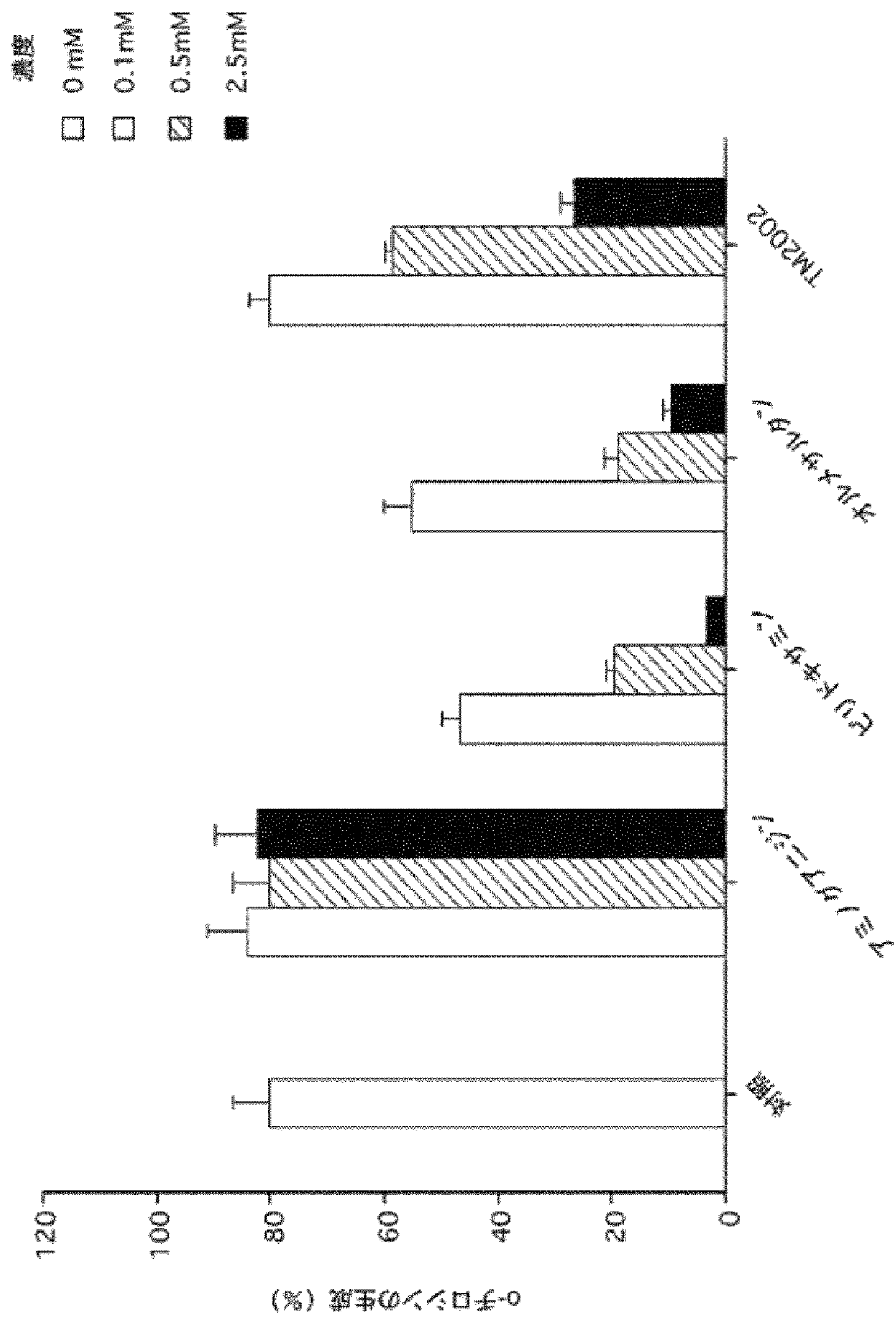


図 3

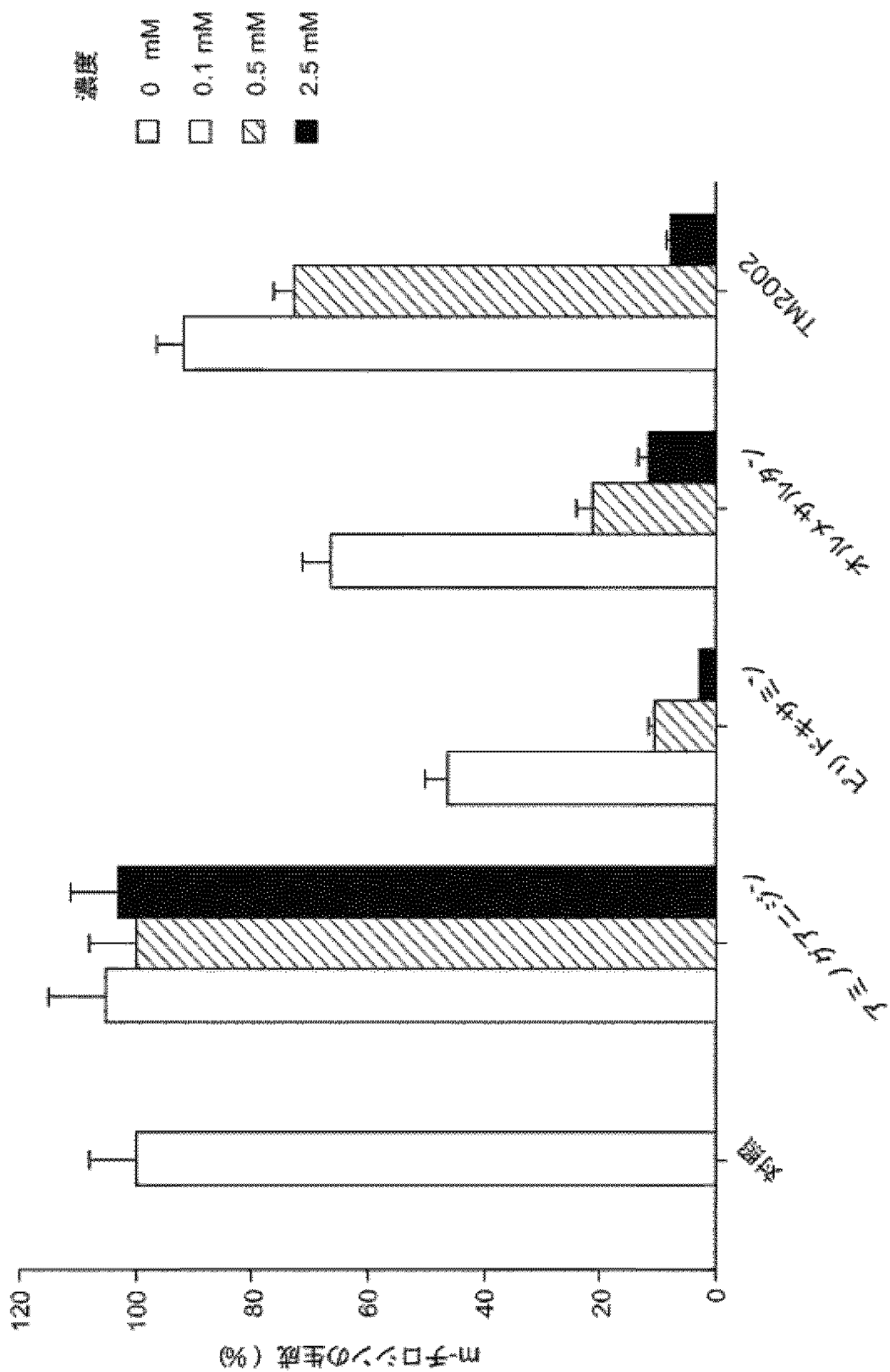
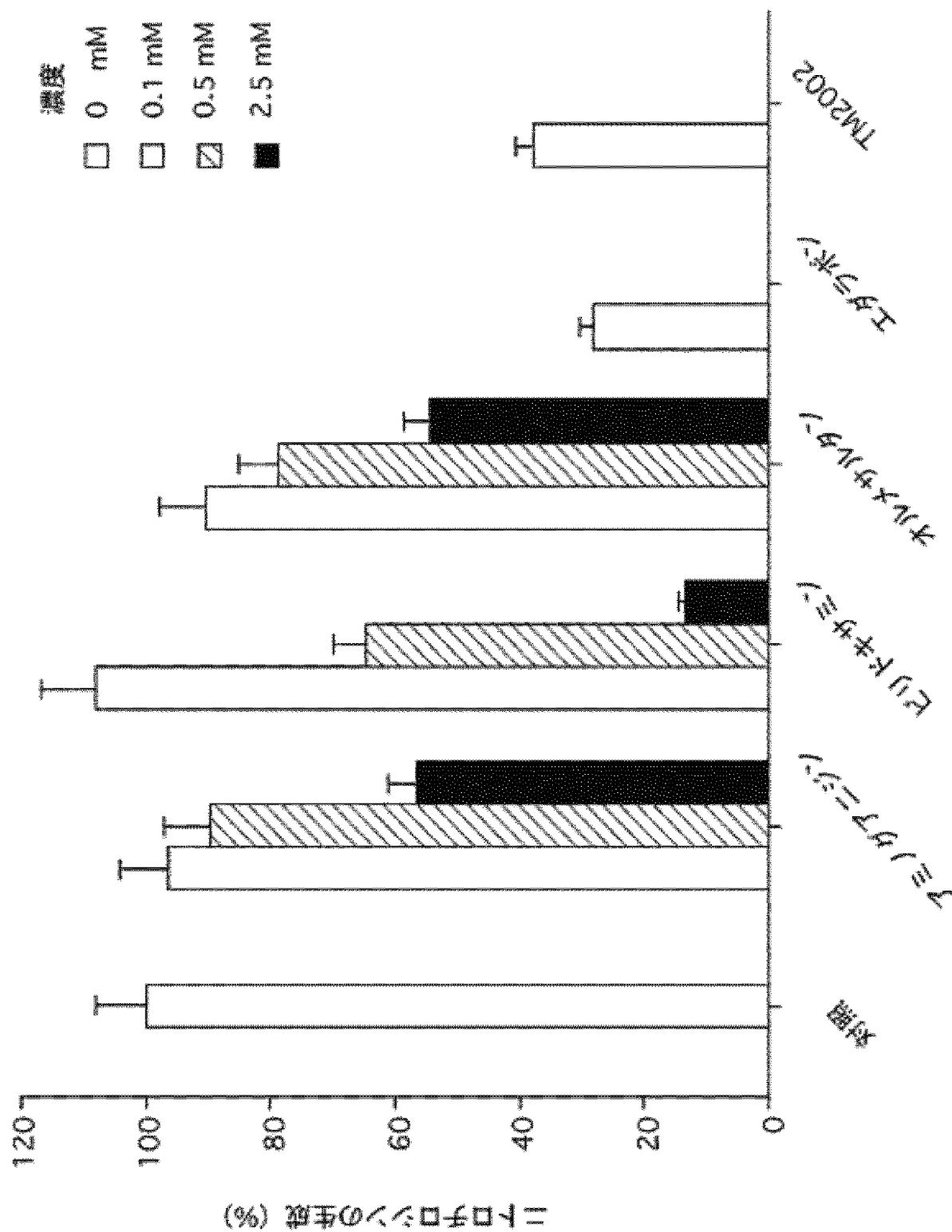


図 4



5



図6

## 薬剤投与による血圧降下作用

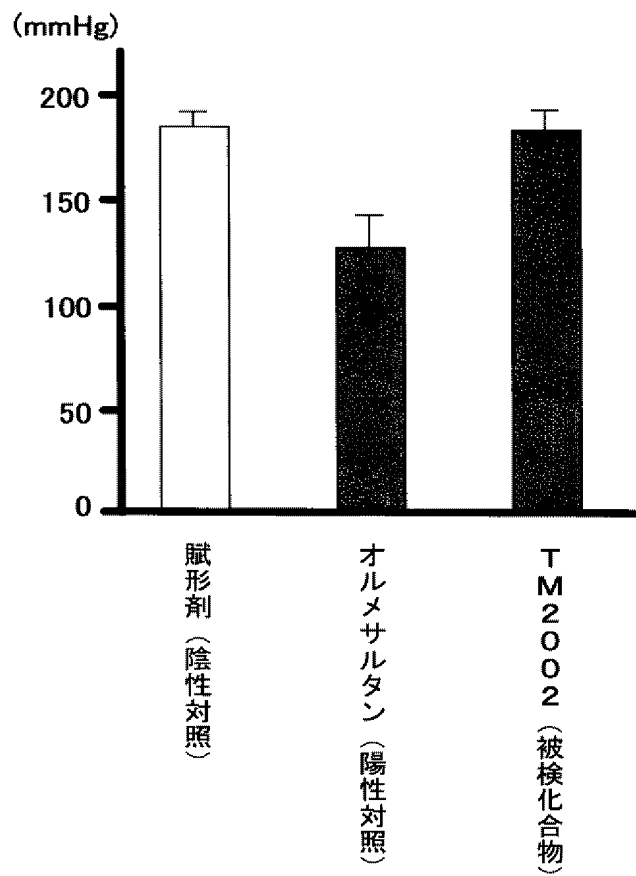
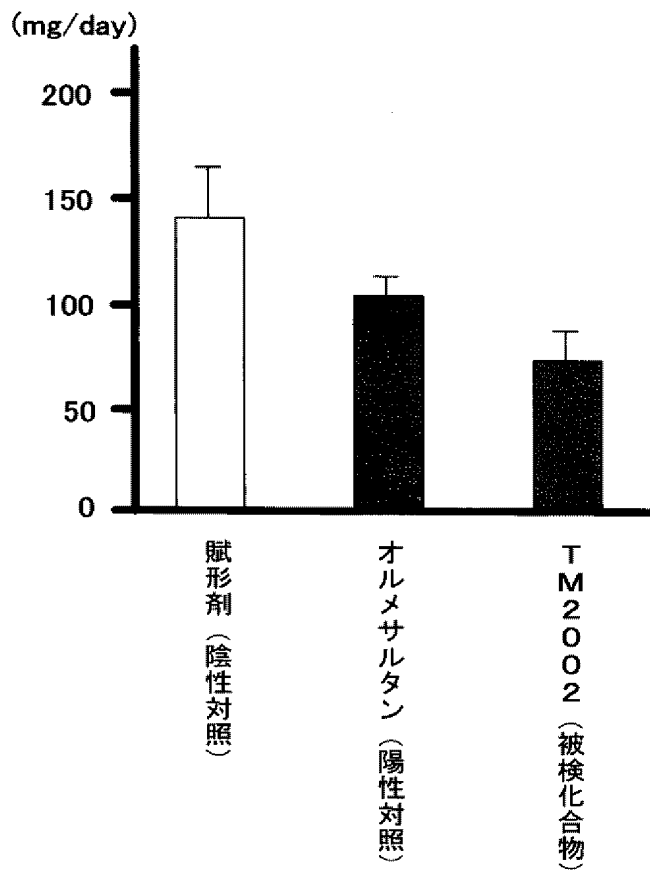


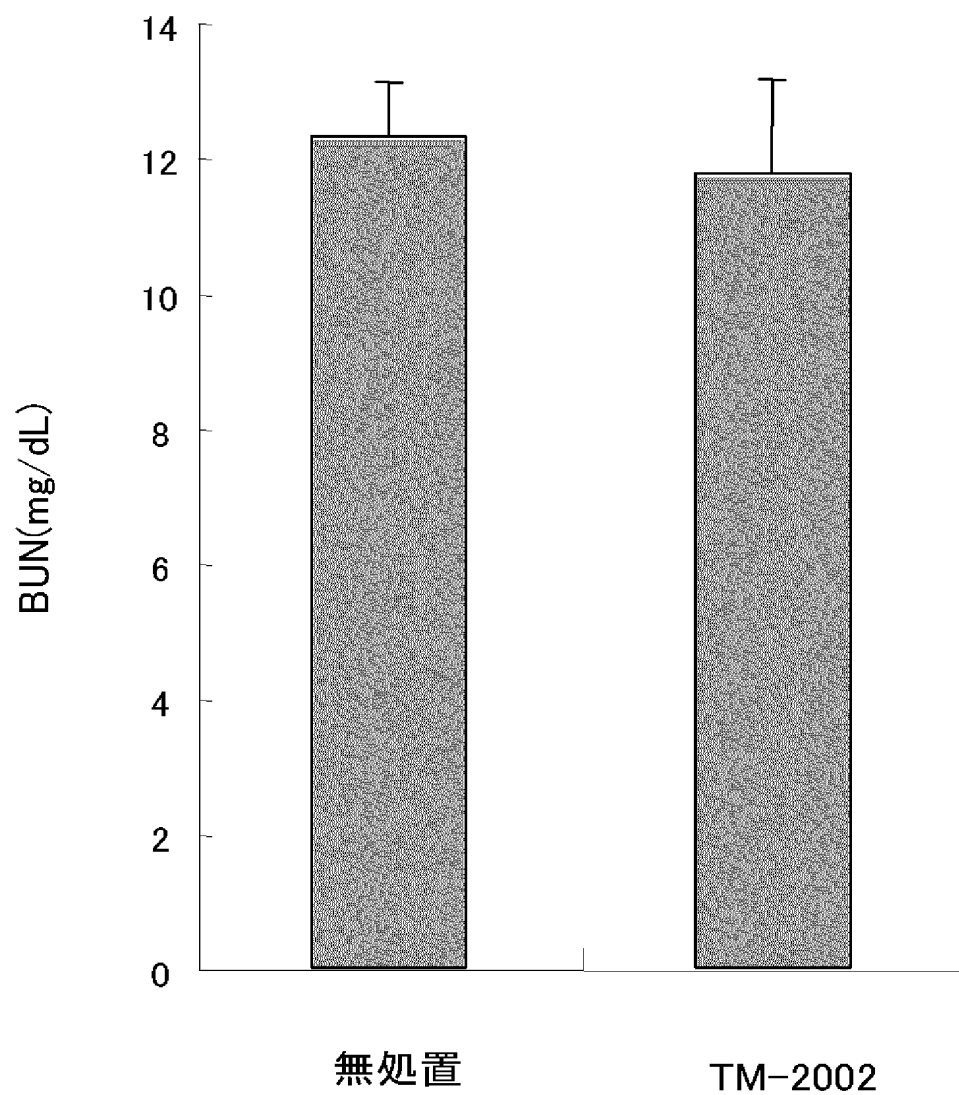
図7

## 薬剤投与による尿蛋白抑制作用



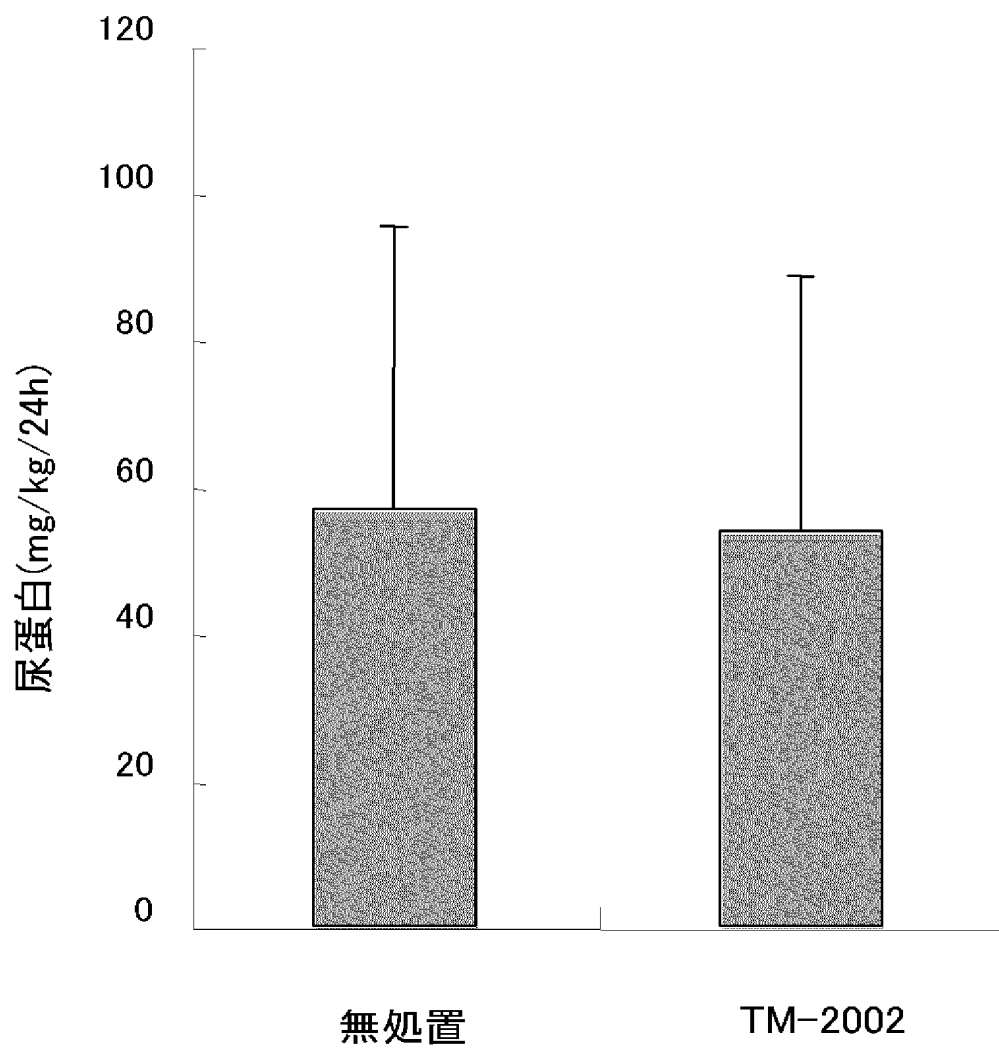
## 図8

## Thy-1 腎炎モデル



## 図9

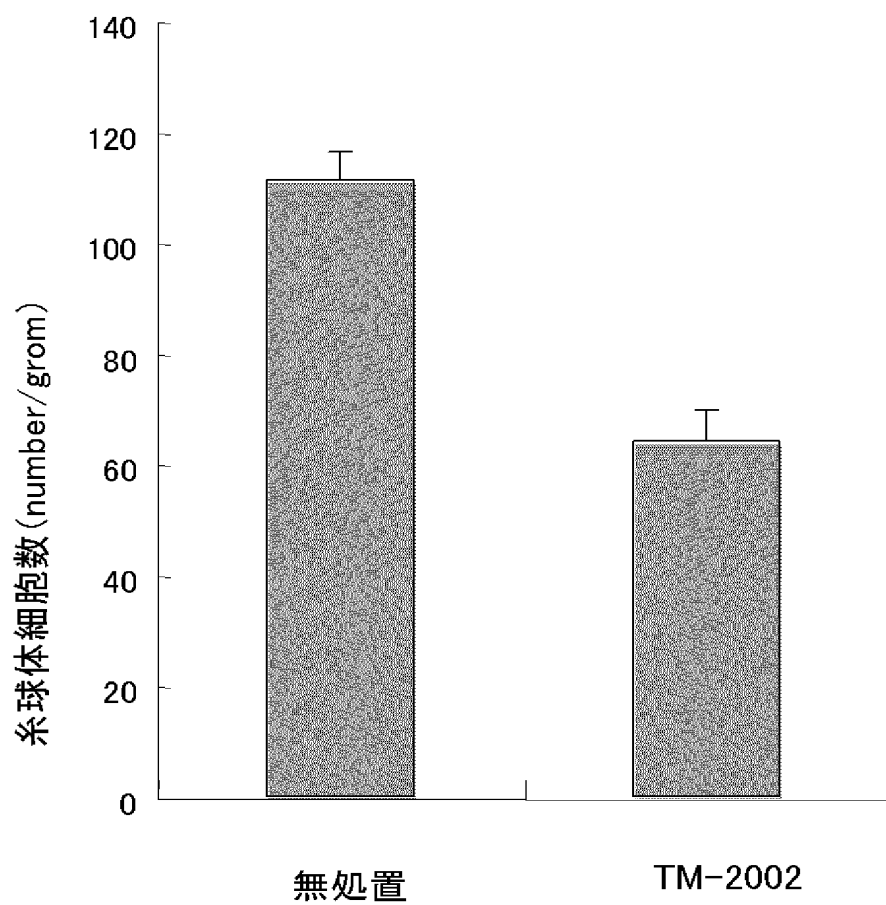
## Thy-1 腎炎モデル





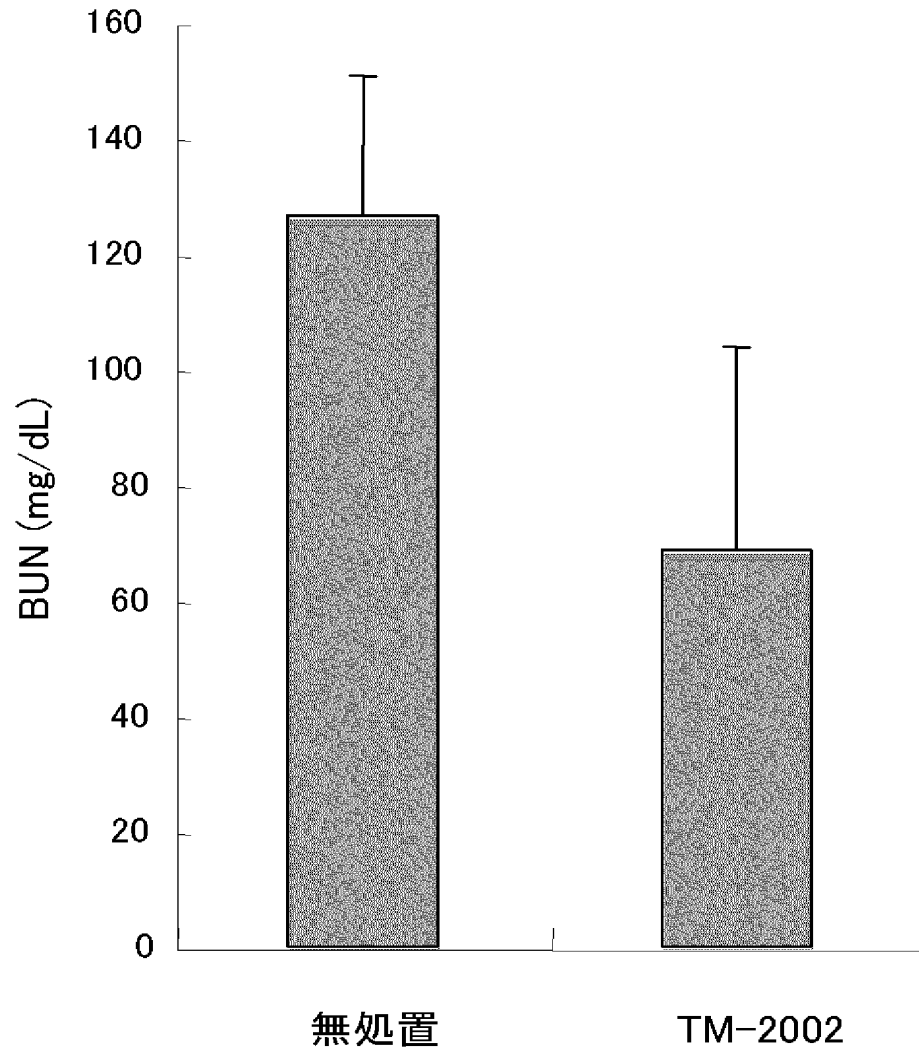
## 図10

## Thy-1 腎炎モデル



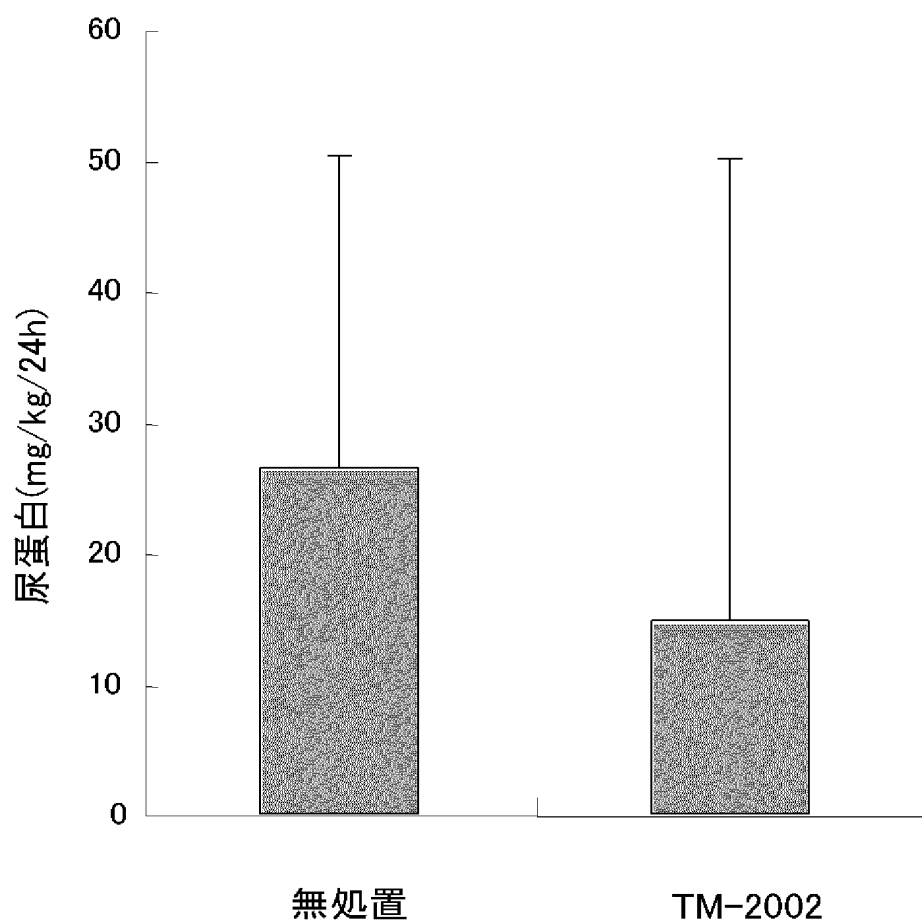
## 図 11

## 虚血再灌流モデル



## 図 12

## 虚血再灌流モデル



## 図13

## 虚血再灌流モデル

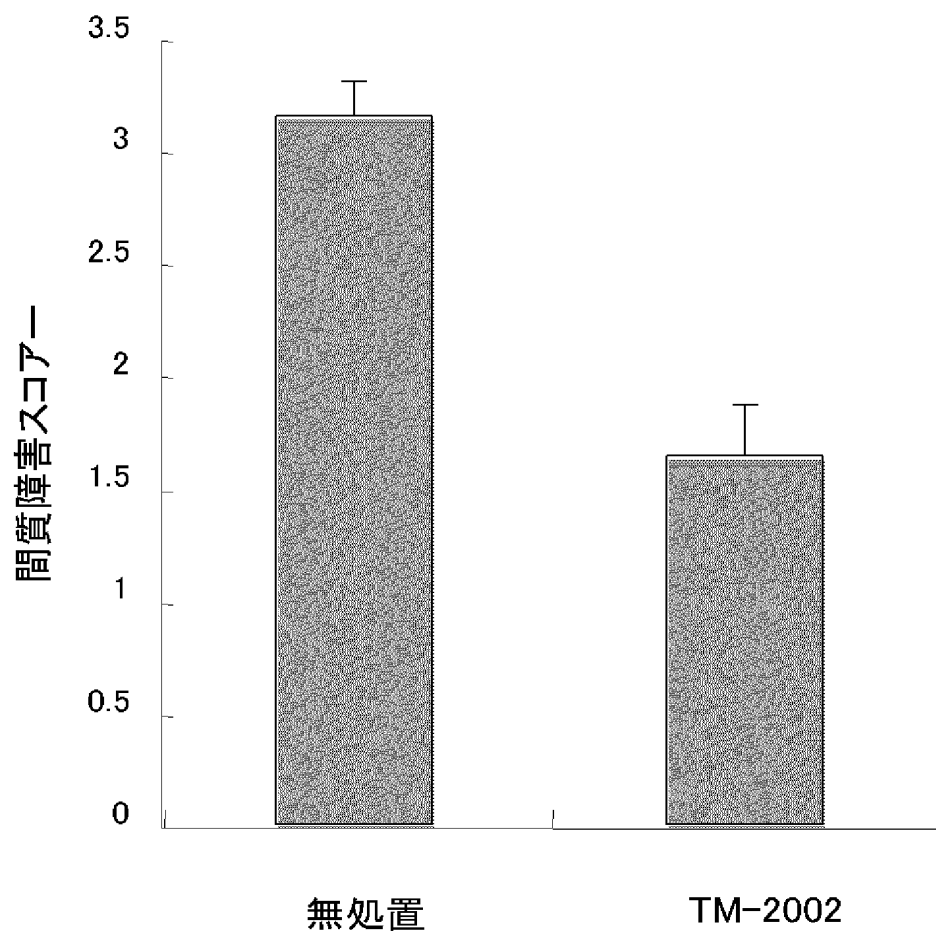


図 1 4

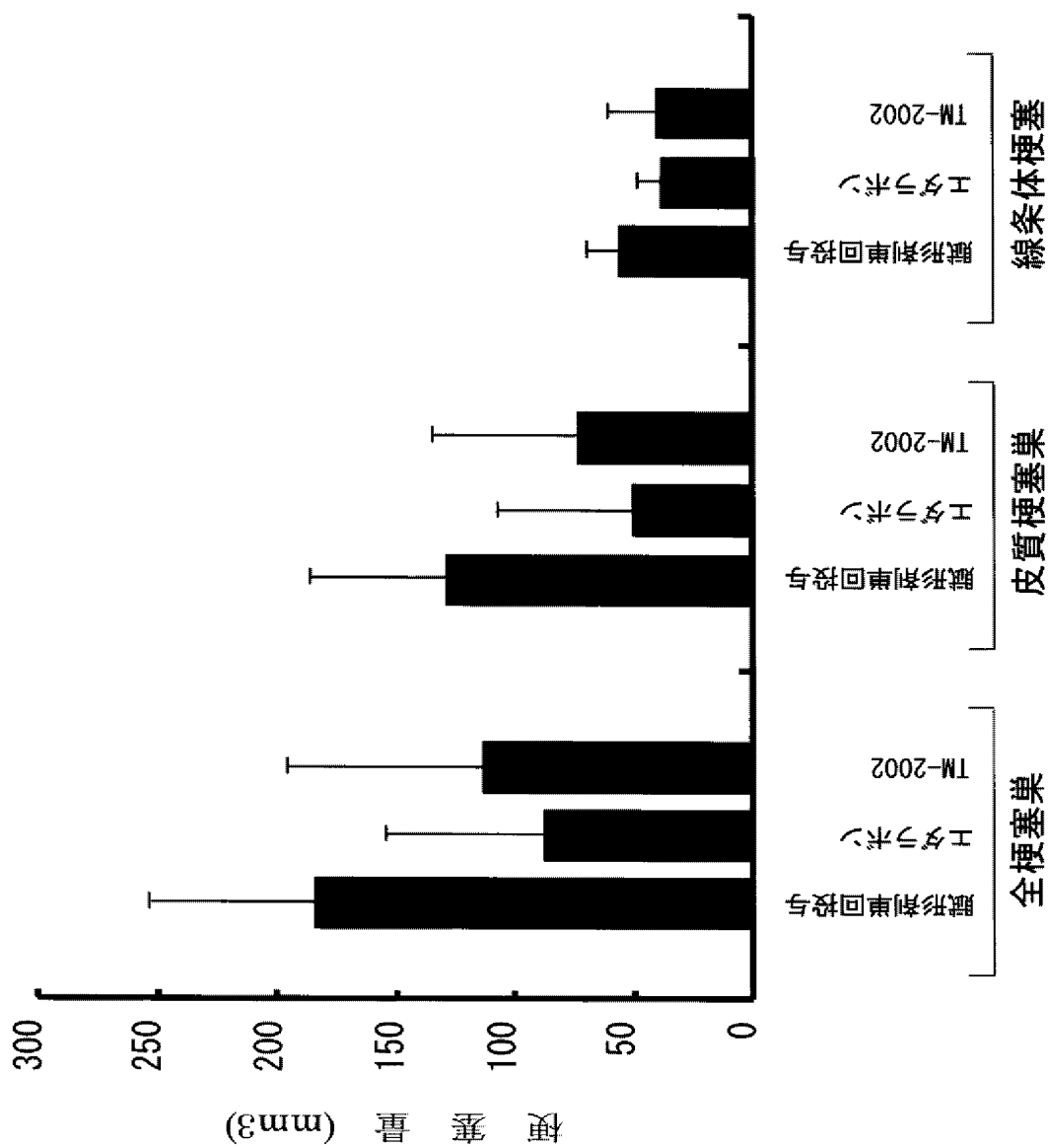
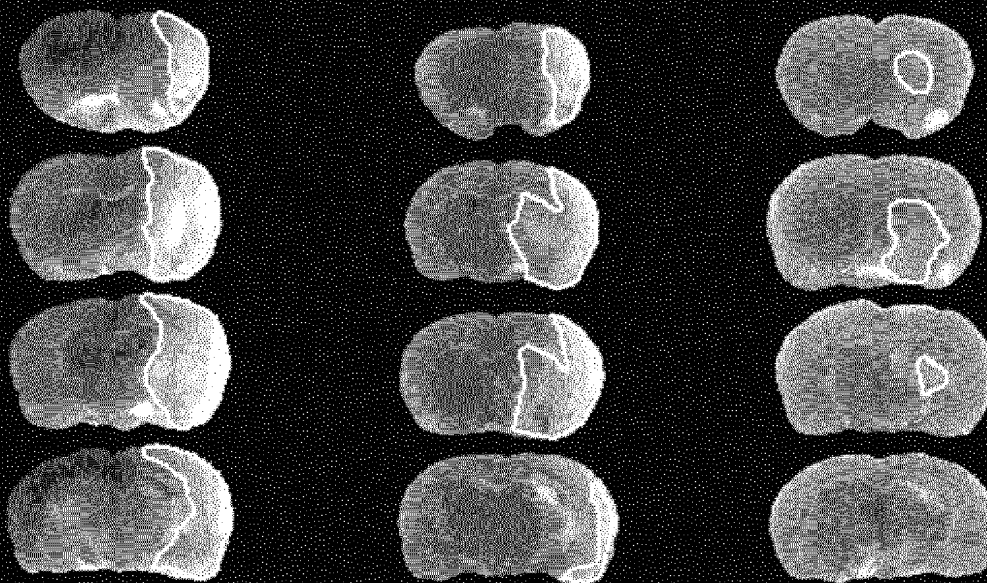


図15

2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride で染色された梗塞範囲



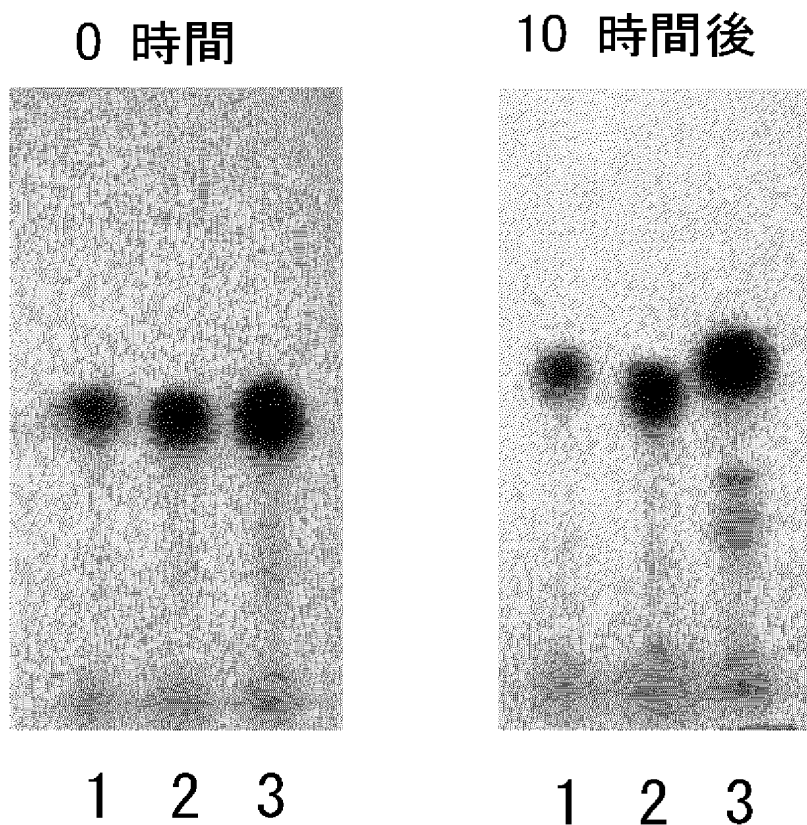
賦形剤単独

エタラボン

TM-2002

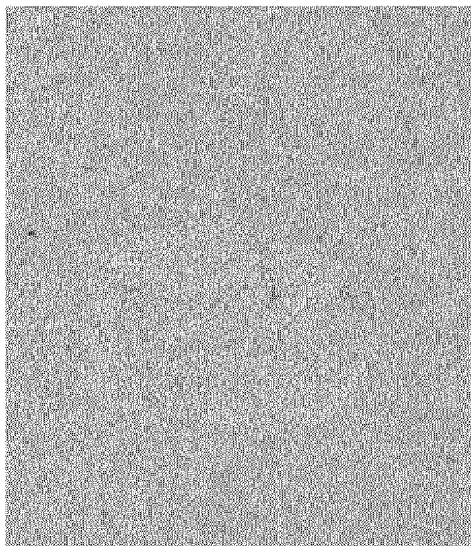
## 図 16

## TM-2002注射用凍結乾燥製剤の安定性

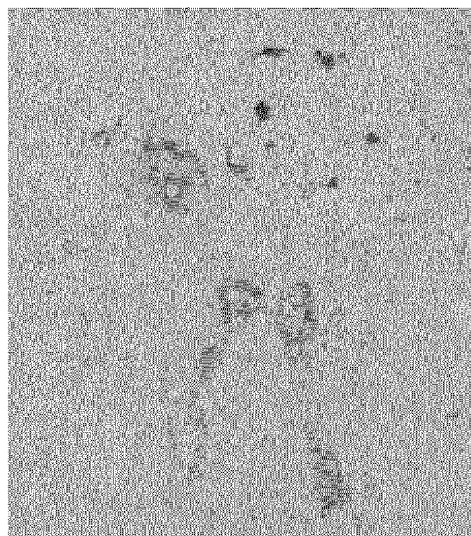


1. TM-2002注射用凍結乾燥製剤の水溶液1mlを生理食塩水1.5mlで希釈した試験液
2. 原料に用いたTM-2002塩酸塩(TLCに使用時に調製)
3. 原料に用いたTM-2002塩酸塩の水溶液

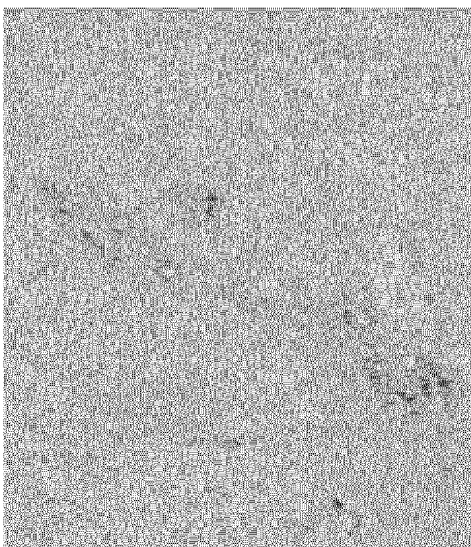
図 17



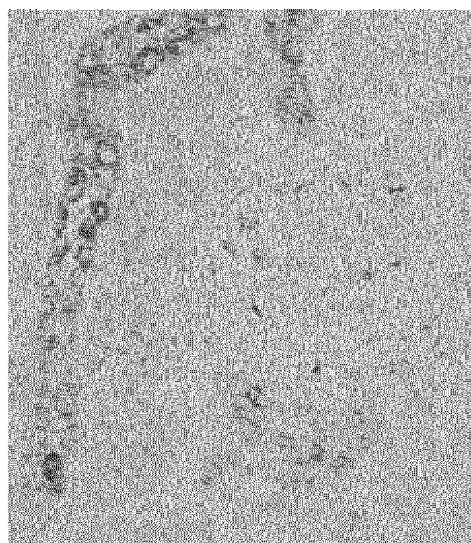
SHRにおけるORP150の免疫染色像薬剤無投与群



SHR/NDmcr-cp TM-2002投与群における  
ORP150の免疫染色像



WKY薬剤無投与群におけるORP150の免疫染色像



SHR/NDmcr-cp薬剤無投与群におけるORP150の  
免疫染色像



図 1 8

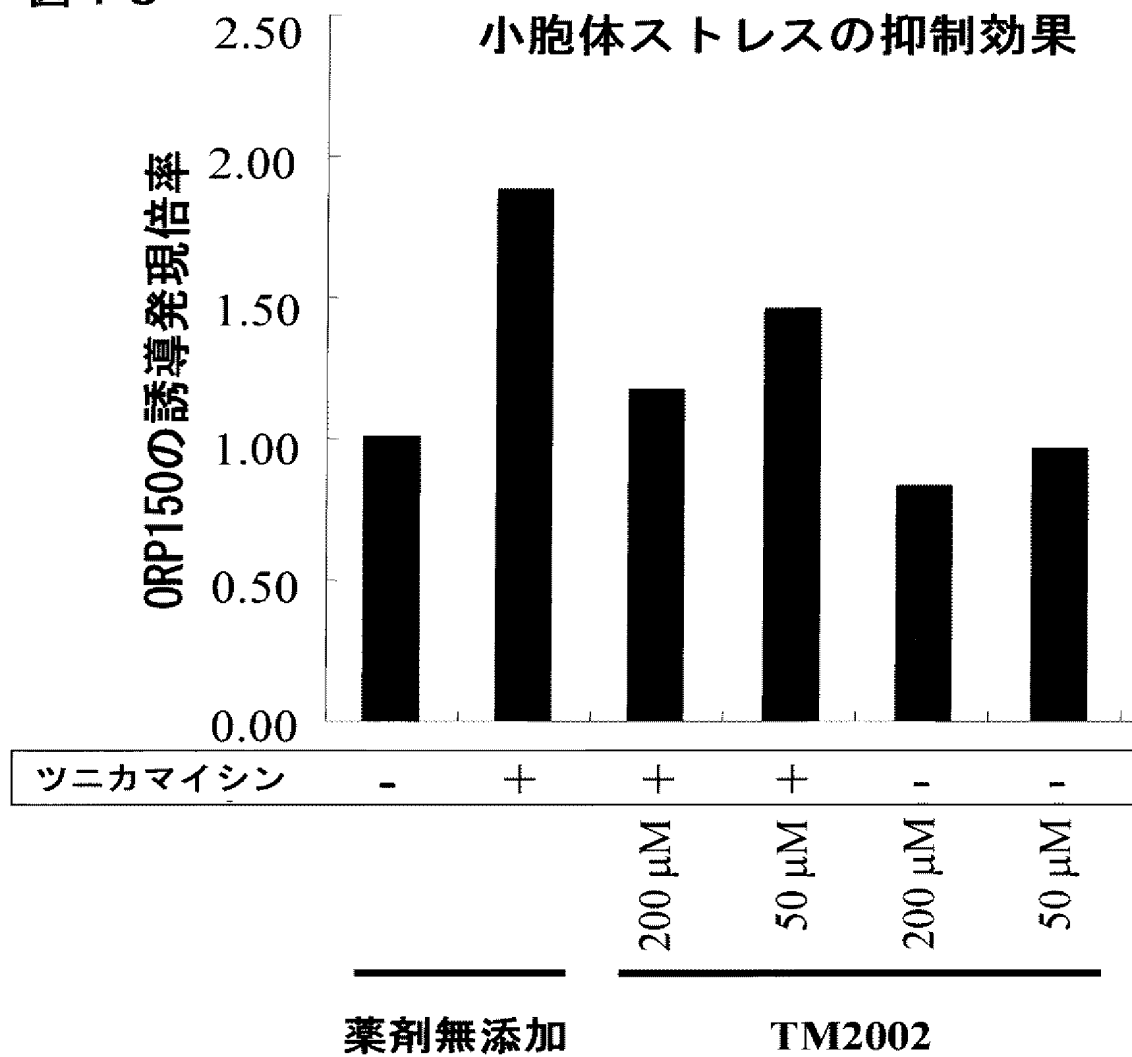
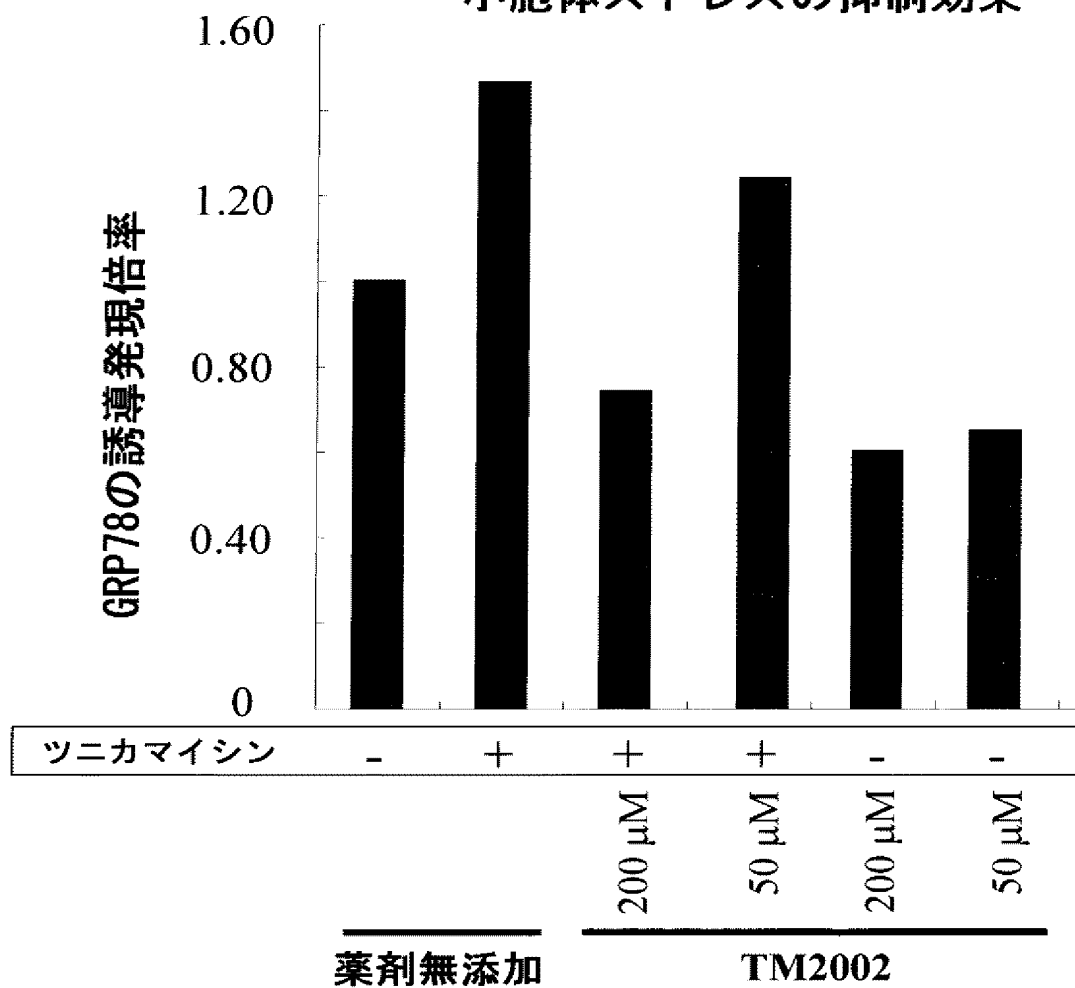


図 19

## 小胞体ストレスの抑制効果



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/018038

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C07D231/22, 231/24, 231/46, 231/50, 231/52, 495/10, 403/12, 417/12, 405/06, 401/06, 403/04, 409/06, 417/04, 409/04, 491/048, 487/10, A61K31/4152, 31/4162, 31/4155, 31/427,

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C07D231/22, 231/24, 231/46, 231/50, 231/52, 495/10, 403/12, 417/12, 405/06, 401/06, 403/04, 409/06, 417/04, 409/04, 491/048, 487/10, A61K31/4152, 31/4162, 31/4155, 31/427,

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), MEDLINE (STN), REGISTRY (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 6-287179 A (Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.), 11 October, 1994 (11.10.94), & US 5453514 A1	1-16
Y	US 2003/0086916 A1 (Goligorsky, Michael S.), 08 May, 2003 (08.05.03),	1-16
X	JP 2003-81830 A (Mitsubishi-Tokyo	21-22
Y	Pharmaceuticals, Inc.), 19 March, 2003 (19.03.03), (Family: none)	1-16
X	WO 2003/024446 A (Mitsubishi Pharma Corp.),	21-22
Y	27 March, 2003 (27.03.03), (Family: none)	1-16



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
16 February, 2005 (16.02.05)

Date of mailing of the international search report  
08 March, 2005 (08.03.05)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/018038

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 3-215426 A (Mitsubishi Kasei Corp.), 20 September, 1991 (20.09.91), (Family: none)	1-16
Y	JP 7-25765 A (Mitsubishi Chemical Corp.), 27 January, 1995 (27.01.95), & EP 633025 A1 & US 5837723 A1	1-16
Y	JP 2-229168 A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 11 September, 1990 (11.09.90), (Family: none)	1-16
Y	JP 2-229169 A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 11 September, 1990 (11.09.90), (Family: none)	1-16
Y	Toshio MIYATA et al., Alterrations in nonenzymatic biochemistry in uremia: Origin and significance of "carbonyl stress" in long-term uremic complications, Kidney International, Vol.55(1999), pages 389 to 399	1-16
P, Y	JP 2004-300153 A (Tokai University), 28 October, 2004 (28.10.04),	1-16

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/018038

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 17-20, 26

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The inventions as set forth in claims 17 to 20 and 26 pertain to methods for treatment of the human body by therapy or methods including such a treatment method and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required to search.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/018038

## Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

(International Patent Classification (IPC))

Int.Cl<sup>7</sup> 31/4709, 31/433, A61K31/4439, 31/4355, 31/416, A61P13/12,  
3/10, 25/00, 27/02, 27/12, 9/10, 13/00, 25/28, 25/16,  
29/00, 19/02, 17/00, 7/08, 13/12, 9/00, 43/00, 39/00,  
39/02

(According to International Patent Classification (IPC) or to both national  
classification and IPC)

## Continuation of B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (International Patent Classification (IPC))

Int.Cl<sup>7</sup> 31/4709, 31/433, A61K31/4439, 31/4355, 31/416, A61P13/12,  
3/10, 25/00, 27/02, 27/12, 9/10, 13/00, 25/28, 25/16,  
29/00, 19/02, 17/00, 7/08, 13/12, 9/00, 43/00, 39/00,  
39/02

Minimum documentation searched (classification system followed by  
classification symbols)

### <Subject of search>

Claims 1 and 21 relate to a compound and protein modifier production inhibitor defined by the desired property of "substituent capable of blocking the linkage of vitamin B6 molecule". Although claims 1 and 21 cover all the inhibitors and compounds having the property, only some of the inhibitors and compounds covered by the claims are disclosed within the meaning of PCT Article 5. Thus, it appears that the requirement of support by disclosure in the description within the meaning of PCT Article 6 is not satisfied.

Further, with respect to the language "compound and protein modifier production inhibitor having introduced therein a substituent capable of blocking the linkage of vitamin B6 molecule", even if technical common knowledge at the filing date of this application is taken into account, the scope of compounds and inhibitors having such property cannot be specified. Consequently, claims 1 and 21 also fail to satisfy the requirement of clarify within the meaning of PCT Article 6.

Therefore, search has been carried out on the compounds and inhibitors identified in claims 2-9 and 22-24.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

nt. C17 C07D231/22, 231/24, 231/46, 231/50, 231/52, 495/10, 403/12, 417/12, 405/06, 401/06, 403/04, 409/06, 417/04, 409/04, 491/048, 487/10, A61K31/4152, 31/4162, 31/4155, 31/427, 31/4709, 31/433, A61K31/4439, 31/4355, 31/416, A61P13/12, 3/10, 25/00, 27/02, 27/12, 9/10, 13/00, 25/28, 25/16, 29/00, 19/02, 17/00, 7/08, 13/12, 9/00, 43/00, 39/00, 39/02

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

nt. C17 C07D231/22, 231/24, 231/46, 231/50, 231/52, 495/10, 403/12, 417/12, 405/06, 401/06, 403/04, 409/06, 417/04, 409/04, 491/048, 487/10, A61K31/4152, 31/4162, 31/4155, 31/427, 31/4709, 31/433, A61K31/4439, 31/4355, 31/416, A61P13/12, 3/10, 25/00, 27/02, 27/12, 9/10, 13/00, 25/28, 25/16, 29/00, 19/02, 17/00, 7/08, 13/12, 9/00, 43/00, 39/00, 39/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
CA (STN), MEDLINE (STN), REGISTRY (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 6-287179 A (山之内製薬株式会社) 1994. 10. 11 & US 5453514 A1	1-16
Y	US 2003/0086916 A1 (Goligorsky, Michael S.) 2003. 05. 08	1-16
X	JP 2003-81830 A (三菱東京製薬株式会社) 2003. 03. 19 (ファミリーなし)	21-22
Y		1-16
X	WO 2003/024446 A1 (三菱ウェルファーマ株式会社) 2003. 03. 27	21-22
Y	(ファミリーなし)	1-16
Y	JP 3-215426 A (三菱化成株式会社) 1991. 09. 20 (ファミリーなし)	1-16

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16. 02. 2005

国際調査報告の発送日

08. 3. 2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

渡辺 仁

4 P

8 2 1 3

電話番号 03-3581-1101 内線 3492

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 7-25765 A(三菱化学株式会社) 1995.01.27 & EP 633025 A1 & US 5837723 A1	1-16
Y	JP 2-229168 A(武田薬品工業株式会社) 1990.09.11 (ファミリーなし)	1-16
Y	JP 2-229169 A(武田薬品工業株式会社) 1990.09.11 (ファミリーなし)	1-16
Y	Toshio MIYATA et al., Alterrations in nonenzymatic biochemis try in uremia:Origin and significance of "carbonyl stress" i n long-term uremic complications, Kidney International, Vol. 55(1999), pp.389-399	1-16
P, Y	JP 2004-300153 A (学校法人東海大学) 2004.10.28	1-16



## 第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 17-20、26 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、  
請求の範囲17-20、及び26に記載された発明は、ヒトの身体の治療による処置方法であるか、あるいはこうした処置方法を含む方法の発明であることから、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

請求の範囲1、及び21は、「ビタミンB6分子の結合を妨げる置換基」という所望の性質により定義された蛋白修飾物生成抑制剤及び化合物に関するものである。そして、請求の範囲1、及び21は、そのような性質を有するあらゆる抑制剤及び化合物を包含するものであるが、PCT第5条の意味において開示されているのは、当該請求の範囲に包含される抑制剤及び化合物のごくわずかな部分にすぎず、PCT第6条の意味での明細書の開示による裏づけを欠くものと認められる。

また、「ビタミンB6分子の結合を妨げる置換基を導入された蛋白修飾生成抑制剤、及び化合物」は、出願時の技術常識を勘案しても、そのような性質を有する抑制剤、及び化合物の範囲を特定できないから、請求の範囲1、及び21はPCT第6条における明確性の要件も欠いている。

よって、調査は、請求の範囲2—9、及び22—24に特定されている抑制剤及び化合物について行った。